

Diagnostyka

PM 7/98 Specyficzne wymagania dla laboratoriów przygotowujących się do akredytacji w zakresie diagnostyki fitosanitarnej

Zakres

Niniejsze wytyczne obejmują specyficzne wymagania w zakresie zarządzania jakością dla laboratoriów przygotowujących się do akredytacji zgodnie z normą ISO/IEC 17025 „*Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących*” (niniejszy dokument zawiera odniesienia do odpowiednich rozdziałów normy ISO/IEC 17025). Należy zauważyć, że w standardach EPPO czasownik „powinien” oznacza najwyższy poziom obowiązku.

Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzony po raz pierwszy we wrześniu 2009 roku.

Znowelizowana wersja zatwierdzona w kwietniu 2014 roku.

1. Wprowadzenie

Rozwój systemów zarządzania jakością (określane również jako systemy zarządzania lub systemy jakości) i akredytacji stał się przedmiotem uwagi wielu laboratoriów w regionie EPPO. W 2007 roku został przyjęty standard EPPO 7/84 „*Podstawowe wymagania w zakresie zarządzania jakością w laboratoriach fitosanitarnych*”. Standard PM 7/84 opisuje podstawowe wymagania w celu ułatwienia laboratoriom zajmującym się diagnostyką agrofagów zaprojektowanie systemu zarządzania jakością. Standard PM 7/98 zawiera dodatkowe wymagania dla laboratoriów ubiegających się o uzyskanie akredytacji. Bazuje on na normie ISO/IEC 17025 „*Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących*” (ISO/IEC, 2005) i powinien być stosowany łącznie ze standardem PM 7/84. Laboratoria zwykle ubiegają się o akredytację w zakresie niewielkiej liczby agrofagów objętych rutynowymi badaniami, a nie wszystkich, pod kątem obecności których prawdopodobnie będą prowadzone badania.

Akredytacja zgodnie z normą ISO/IEC 17025 jest udzielana przez krajowe jednostki akredytujące, dlatego też ważnym jest, aby laboratoria wypracowały dobry system komunikacji i regularne kontakty z tymi jednostkami w trakcie procesu akredytacji.

Niniejszy dokument odnosi się do jakości działań diagnostycznych i nie są w nim poruszane zagadnienia bezpieczeństwa i higieny pracy. Jednakże, praktyka laboratoryjna powinna być dostosowana do krajowych przepisów bhp.

2. Zakres akredytacji: stały i elastyczny

Historycznie rzecz biorąc, akredytacja laboratoriów zwykle bazowała na stałym zakresie, który powinien jasno i jednoznacznie definiować metody objęte akredytacją w laboratorium (np. metoda immunofluorescencji do wykrywania *Ralstonia solanacearum* w bulwach ziemniaka).

Jednakże, w przypadku stałego zakresu nie jest możliwe szybkie jego rozszerzenie o nowe lub zmodyfikowane metody, nawet jeśli kompetencje laboratorium w wykonywaniu i walidowaniu pokrewnych metod zostały już ocenione przez jednostkę akredytującą. Chociaż wniosek o rozszerzenie zakresu akredytacji może zostać złożony w dowolnym czasie, czasochłonność tego procesu może w rzeczywistości uniemożliwić szybką reakcję na żądania klienta. W konsekwencji wypracowano pojęcie zakresu elastycznego.

Elastyczny zakres akredytacji umożliwia laboratorium stosowanie pewnych metod i prezentowanie uzyskiwanych z ich zastosowaniem wyników jako akredytowane, nawet jeśli metody te nie są wprost wymienione w zakresie akredytacji laboratorium („*Wymagania EA dotyczące akredytacji w zakresach elastycznych*” EA-2/15, 2008). Przykładowe sytuacje, kiedy może wystąpić potrzeba zastosowania zakresu elastycznego są następujące:

- Optymalizacja danej metody.
- Modyfikacja istniejącej metody w celu poszerzenia zakresu jej zastosowania (np. wprowadzenie nowych matryc).
- Włączenie metody równoważnej to tej, która jest już objęta zakresem akredytacji.

Pojęcie zakresu elastycznego obejmuje stopień elastyczności, który jest zwykle uzgadniany w konsultacjach z jednostką akredytującą. Jednakże, należy zauważyć, że stopień elastyczności może być różnie interpretowany na poziomie krajowym. Dotychczasowe doświadczenia laboratoriów fitosanitarnych wskazują, że zakres elastyczny jest pomocny w uzyskaniu akredytacji nowej metody jeszcze przed auditem prowadzonym przez jednostkę akredytującą. Jednakże wiąże się to z większą odpowiedzialnością laboratorium, które musi wykazać, że metody są właściwe, odpowiednie do zamierzonego zastosowania oraz są stosowane w sposób kompetentny i systematyczny. Jeśli laboratorium podejmie decyzję o umieszczeniu danej metody w sprawozdaniu z badań jako akredytowanej, a kolejny audit wykaże problemy związane z zastosowaną procedurą, wyniki mogą zostać uznane za nieważne oraz może zaistnieć konieczność anulowania wszystkich sprawozdań z badań. Dlatego też ważne jest, aby przed ubieganiem się o przyznanie elastycznego zakresu akredytacji, laboratorium zdobyło doświadczenie w stosowaniu zakresu stałego, jako że w obydwu tych przypadkach muszą być spełnione wszystkie wymagania normy ISO/IEC 17025. Niemniej jednak, laboratorium może już być akredytowane w odniesieniu do działalności innej niż diagnostyka fitosanitarna. Doświadczenie ze stałym zakresem akredytacji w innej dziedzinie działalności może być wystarczającą podstawą do ubiegania się bezpośrednio o akredytację w obszarze diagnostyki fitosanitarnej w zakresie elastycznym.

3. Terminologia i definicje

Definicje terminów używanych w niniejszym standardzie są zawarte w standardzie PM 7/76 „*Stosowanie protokołów diagnostycznych EPPO*”.

W niniejszym standardzie termin „metoda” odnosi się do zastosowania techniki do specyficznego agrofaga i specyficznej matrycy. W laboratoriach stosujących metody wykrywania agrofagów kwarantannowych wyniki badania są podawane w aspekcie jakościowym (wynik pozytywny, negatywny lub nieokreślony). Uznaje się, że wyniki uzyskane pewnymi metodami mają charakter jakościowy (np. gęstość optyczna w teście ELISA, liczba komórek w teście IF, wartość Ct w metodzie real-time PCR, pomiary cech morfologicznych itp.). Jednakże takie dane ilościowe są stosowane do określenia wyniku jakościowego (pozytywny/negatywny/nieokreślony). Przedmiotowe techniki obejmują: testy biologiczne, testy biochemiczne, techniki „fingerprint”, techniki izolacji/ekstrakcji, techniki molekularne, techniki morfologiczne i morfologiczno-metryczne, test patogeniczności oraz techniki serologiczne.

4. Wymagania dotyczące zarządzania (ISO17025 punkt 4)

Laboratorium powinno ustanowić, wdrożyć i utrzymywać system zarządzania jakością obejmujący całą siedzibę laboratorium i działania w akredytowanym zakresie diagnostyki agrofagów.

System zarządzania jakością powinien opisywać warunki i objętą nim działalność (łącznie ze szczegółowymi informacjami dotyczącymi klienta i agrofagów, pod kątem których są prowadzone badania). System jakości powinien być udokumentowany, a dokumenty jakości powinny być archiwizowane (patrz również poniżej).

System zarządzania laboratorium: opis w analogicznym rozdziale standardu PM 7/84.

4.1 Zaangażowanie najwyższego kierownictwa (ISO 17025, punkt 4.2.3)

Najwyższe kierownictwo laboratorium (np. osoba kierująca instytutem) powinno być zaangażowane w osiąganie celów systemu zarządzania i stałe doskonalenie jego skuteczności. Kierownictwo powinno ono dostarczać dowody swojego zaangażowania.

4.2 Ciągłe doskonalenie i przeglądy zarządzania (ISO 17025, punkt 4.10 i 4.15)

System zarządzania jakością w laboratorium, łącznie z badaniami, powinien być poddawany okresowemu przeglądowi przez najwyższe kierownictwo, tak by zapewnić jego stałą odpowiedniość i skuteczność oraz wprowadzanie niezbędnych zmian i ulepszeń. Laboratorium powinno wdrożyć program stałego doskonalenia.

Niezbędne informacje mogą pochodzić z mechanizmów wewnętrznych oraz oceny zewnętrznej. Mechanizmy wewnętrzne obejmują:

- Określenie celów jakości i adekwatnych wskaźników jakości (np. wystawianie wyników badań w odpowiednim czasie lub udoskonalony sposób pozyskiwania informacji zwrotnych od klienta). Powinno to być poddawane ocenie przez kierownictwo.
- Organizowanie spotkań personelu w celu:
 - zaplanowania działań zapobiegawczych i oceny skuteczności działań korygujących,
 - dokonania gruntownej analizy wyników auditów wewnętrznych,
 - przeanalizowania skarg i związanych z nimi działań korygujących itp.,
 - zidentyfikowania potrzeb w zakresie szkoleń,
 - zebrania propozycji personelu dotyczących doskonalenia.
- Procedury uzyskiwania informacji zwrotnych od klientów.
- Analizy trendów (w zakresie technicznym i zarządzania).

Ważnymi elementami stałego doskonalenia są również oceny w ramach auditów zewnętrznych, wyniki porównań międzylaboratoryjnych (badań biegłości i ocen działania metody).

5. Wymagania techniczne (ISO 17025, punkt 5)

5.1. Postanowienia ogólne (ISO 17025, punkt 5.1)

Informacje są dostępne w rozdziale standardu PM 7/84 o tym samym tytule.

5.2. Personel (ISO 17025, punkt 5.2)

Informacje są dostępne w rozdziale standardu PM 7/84 o tym samym tytule.

5.3. Warunki lokalowe i środowiskowe (ISO 17025, punkt 5.3)

Informacje są dostępne w rozdziale standardu PM 7/84 o tym samym tytule.

5.4. Metody badawcze (ISO 17025, punkt 5.4)

5.4.1. Postanowienia ogólne (ISO 17025 punkt 5.4.1)

Laboratorium powinno stosować właściwe techniki i procedury dla wszystkich metod objętych zakresem jego działalności. Dotyczy to pobierania próbek, tam gdzie to właściwe, postępowania z próbkami, ich transportowania, przechowywania, przygotowania i badania. Przewiduje się, że laboratoria diagnostyczne będą dysponowały wiedzą na temat biologii organizmów i będą ją uwzględniały podczas wydzielania podpróbek i/lub przygotowywania próbki do analizy oraz postępowania z próbką. Zakupione zasoby, odczynniki i materiały ulegające zużyciu w trakcie badań powinny być odpowiednie do zamierzonego zastosowania.

Wszystkie instrukcje, normy, podręczniki, informacje dostarczone przez producenta i dane odniesienia istotne dla pracy laboratorium powinny być stale aktualizowane i łatwo dostępne dla personelu.

5.4.2 Wybór metod (ISO 17025 punkt 5.4.2)

Laboratorium powinno stosować metody badawcze, które są odpowiednie do warunków ich użycia (patrz Standard EPPO PM 7/76 „*Stosowanie protokołów diagnostycznych EPPO*”). Metody opisane w przepisach prawnych (np. przepisy Unii Europejskiej i przepisy krajowe) są obowiązkowe w krajach, których dotyczą. Jeśli nie ma metod obligatoryjnych, powinno się preferować stosowanie metod opublikowanych jako normy międzynarodowe, regionalne lub krajowe. Ilekroć metody takie nie są dostępne lub w sytuacji gdy możliwe jest udoskonalenie działania metody, można wziąć pod uwagę metody opracowane w laboratorium lub zaadaptowane przez laboratorium.

Laboratorium powinno zapewnić, że stosuje ostatnie ważne wydanie metody, chyba że nie jest to właściwe lub nie jest możliwe¹. Kiedy jest to konieczne, opis metody powinien być uzupełniony o dodatkowe szczegóły, aby zapewnić jej jednakowe stosowanie w laboratorium.

Laboratorium przygotowujące się do akredytacji powinno stosować wyłącznie metody zwalidowane. Jeśli nie mamy do czynienia z takim przypadkiem, metody powinny zostać poddane procesowi walidacji w laboratorium (patrz 5.4.3). W przypadku stosowania metody zwalidowanej, laboratorium powinno dostarczyć obiektywne dowody na to, że jest w stanie stosować metodę zgodnie z ustanowionymi parametrami metody (patrz 5.4.4).

Metody o określonych parametrach walidacyjnych są uznawane w niniejszym dokumencie jako „metody w pełni zwalidowane” i w ISO 17025 odnoszą się do „metod znormalizowanych”.

5.4.3 Walidacja metod (ISO 17025 punkt 5.4.5)

Walidację przeprowadza się w celu dostarczenia obiektywnego dowodu na to, że metoda jest właściwa do warunków jej stosowania (patrz Standard EPPO PM 7/76, w którym opisane są różne zamierzone zastosowania). Ocena działania metody (ang. test performance study) powinna stanowić ważny element procesu walidacji.

5.4.3.1 Walidacja metod innych niż te oparte na technikach morfologicznych i morfometrycznych

Informacje ogólne

Metoda jest uznawana za w pełni zwalidowaną, jeśli określone są jej parametry walidacyjne: czułość analityczna, specyficzność analityczna, powtarzalność i odtwarzalność. W zależności od zakresu metody, może być również konieczne określenie selektywności. Może również zaistnieć potrzeba dostarczenia przez laboratorium dodatkowych danych dotyczących specyficzności analitycznej, w zależności od warunków lokalnych (np. prawdopodobieństwo fałszywych reakcji z blisko spokrewnionymi organizmami, które nie zostały uwzględnione w pierwotnych danych). Jeśli takie dane są dostępne, metody takie są uznawane za zwalidowane. Jeśli wartości parametrów walidacyjnych metody nie są dostępne lub osiągalne (np. w opublikowanych źródłach lub Bazie Danych EPPO dotyczącej Ekspertyzy

¹Laboratorium może kontynuować stosowanie poprzedniej wersji metody, jeśli jest ona nadal odpowiednia do warunków użycia.

Laboratoryjnej²), laboratorium powinno wypracować brakujące dane lub wyjaśnić, dlaczego nie są one możliwe do wypracowania. Jeśli wartości parametrów walidacyjnych są dostępne częściowo, laboratorium powinno zweryfikować, czy może ono stosować metodę zgodnie z nimi (patrz 5.4.4).

Nie wszystkie metody objęte Protokołami Diagnostycznymi EPPO są zwalidowane. Ankieta dotycząca stosowania metod uwzględnionych w Protokołach Diagnostycznych EPPO, przeprowadzona w 2008 roku i powtórzona w roku 2013 (Petter i Suffert, 2010) wykazała, że metody przedstawione w Dodatku 1 są szeroko stosowane. Konsekwentnie, Panel EPPO ds. diagnostyki uznał, że metody te z pewnością są powtarzalne i odtwarzalne. Laboratorium, wdrażając te metody powinno wypracować lub uzyskać co najmniej dane walidacyjne dotyczące czułości analitycznej i specyficzności analitycznej.

Regularny program przeglądu Protokołów Diagnostycznych EPPO dotyczy uzupełnienia o dane walidacyjne.

Proces walidacji

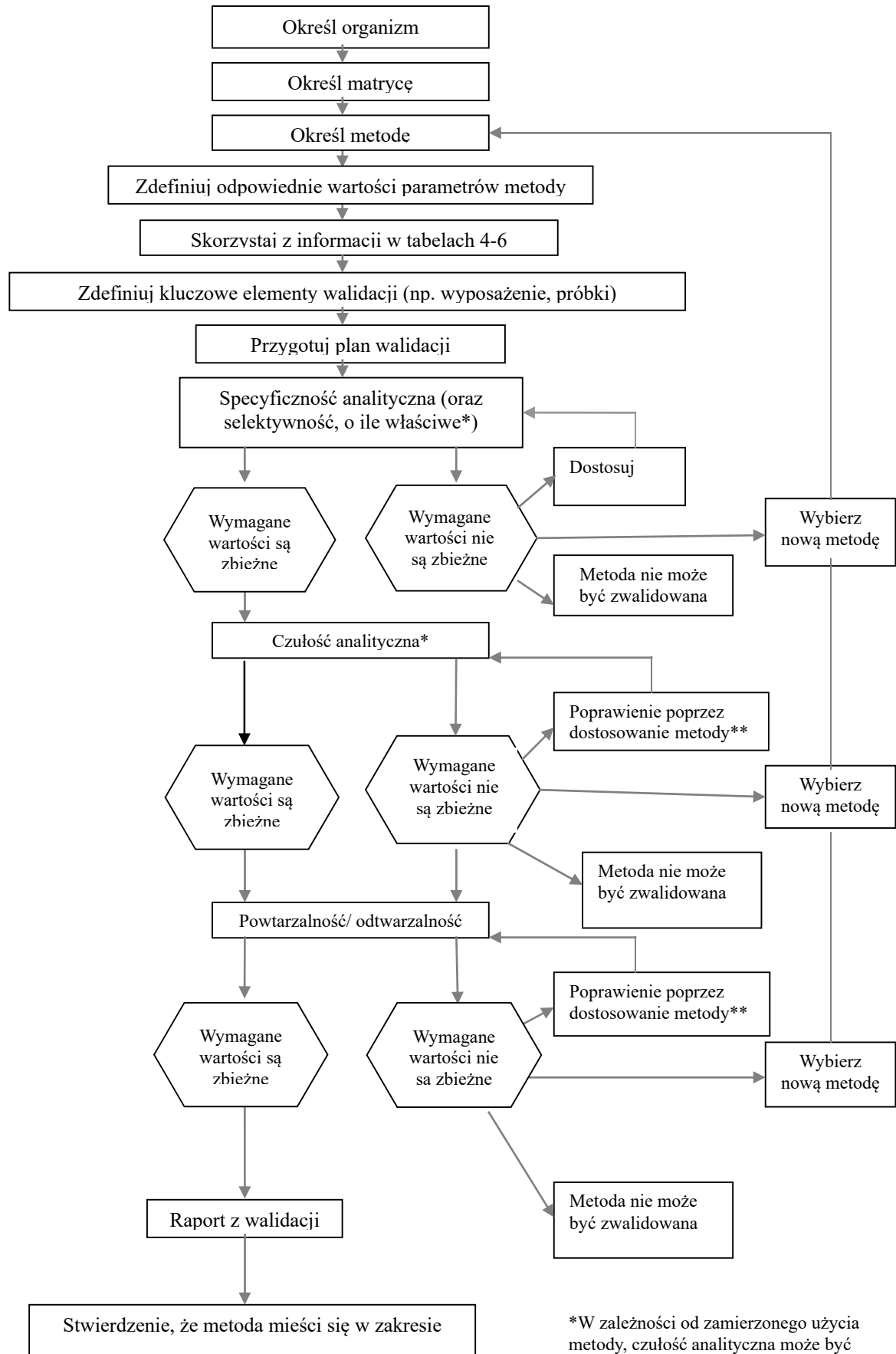
Jak wspomniano w normie ISO 17025 ‘laboratorium powinno zapisywać otrzymane wyniki i procedurę zastosowaną do walidacji’.

Ogólny opis procesu walidacji przedstawiono poniżej (patrz również Rysunek 1). Więcej szczegółowych wskazówek podano w tabelach 4–9 zawartych w Dodatku 5.

- Określ zakres metody, np. wykrywanie i/lub identyfikacja organizmu x w matrycy y techniką z, z uwzględnieniem wszelkich specyficznych wymagań dotyczących warunków stosowania metody (przykłady podano w standardzie PM 7/76).
- Uwzględnij wymagania techniczne w celu określenia parametrów metody, takich jak specyficzność analityczna, czułość analityczna, selektywność, odtwarzalność i powtarzalność, poprzez zapoznanie się z wytycznymi w tabelach 1–6, o ile jest to wymagane. Następnie określ rodzaj i skład próbek potrzebnych do przeprowadzenia walidacji. Walidacja ma być przeprowadzona z użyciem materiałów odniesienia (definicję podano w standardzie PM 7/84), łącznie ze sztucznie porażonymi próbkami lub próbkami sfortyfikowanymi. Przy stosowaniu kultur lub izolatów do testów biologicznych, należy wziąć pod uwagę, by miały one udowodnioną wirulencję.
- Zaplanuj i przeprowadź walidację pod kątem pojedynczych parametrów metody lub w połączeniu. Zaleca się postępowanie zgodnie z Rysunkiem 1.
- Zaprezentuj wyniki walidacji w raporcie z walidacji z uwzględnieniem wniosku, czy walidowana metoda spełnia określone wymagania.
- Korzystne może być zastosowanie formularza ‘Stwierdzenie walidacyjne’ przedstawionego w Dodatku 3.

Alternatywnym sposobem walidacji, odpowiednim w pewnych sytuacjach, może być porównanie metody (A) ze zwalidowaną metodą (B) (Patrz Dodatek 2). Sposobem tym można jedynie wykazać, że np. metoda A jest równie dobra jak zwalidowana metoda B, biorąc pod uwagę wybrane parametry walidacyjne.

²<http://dc.eppo.int>



Rys.1. Proces walidacji

Opisane tutaj procedury walidacji (a w szczególności wyjaśnienia przedstawione w tabelach 4–9 zawartych w Dodatku 5) powinny być traktowane jak ogólne wskazówki, zgodnie z którymi metoda może być walidowana. Liczby podane w tych tabelach wynikają z doświadczenia ekspertów z paneli EPPO zajmujących się diagnostyką, związanego z walidacją metod. Zakres walidacji stanowi wypadkową kosztów, ryzyka i technicznego uzasadnienia. Mogą być niezbędne odstępstwa od tych wytycznych w zależności od kombinacji agrofag/roślina. W takim przypadku należy udokumentować przyczyny takiego odstępstwa. Przedstawienie w niniejszym dokumencie szczegółowego opisu w odniesieniu do każdej takiej kombinacji nie jest możliwe.

Walidacja po wprowadzeniu znacznej zmiany

Jeśli laboratorium wprowadza znaczne zmiany do "w pełni zwalidowanej metody" (np. badanie poza oryginalnym zakresem), taka "nowa" metoda musi być poddana walidacji. Jeśli zmiana, którą wprowadza laboratorium jest niewielka, powinna być przeprowadzona ocena, czy zmiana taka wymaga przeprowadzenia i udokumentowania walidacji lub weryfikacji. Wszelkie zmiany powinny być autoryzowane przez odpowiednią osobę i, jeśli jest to właściwe, przez klienta, oraz należy poinformować jednostkę akredytującą.

Dodatkowe informacje

Zebrane dane i wyniki walidacji przeprowadzonej w laboratorium (w szczególności te odnoszące się do odtwarzalności), jak również wyniki porównań międzylaboratoryjnych (badań biegłości), mogą dostarczać wskaźników dotyczących odporności metody na czynniki zewnętrzne, np. w jakim stopniu różne odczynniki czy zmienione warunki stosowania metody wpływają na ustanowione wartości parametrów metody. Może to również dostarczyć danych na temat czułości diagnostycznej i specyficzności diagnostycznej poprzez porównanie z metodą (metodami) alternatywnymi.

5.4.3.2. Walidacja metod morfologicznych i morfometrycznych

Uznaje się, że procedury w zakresie technik morfologicznych i morfometrycznych stanowią ostatecznie ocenę w oparciu o opinię ekspercką. Stąd walidacja nie może zostać przeprowadzona według procedury stosowanej dla innych metod. Wytyczne w sprawie walidacji metod morfologicznych i morfometrycznych są podane w Dodatku 6. Wytyczne te mają zastosowanie w odniesieniu do takich metod niezależnie od dziedziny w jakiej są używane (entomologia, nematologia, mikologia, botanika itp.). Laboratorium powinno być w stanie uzasadnić dokonany wybór metod morfologicznych i morfometrycznych, w szczególności tych, które nie są opisane w standardach międzynarodowych czy recenzowanych czasopismach specjalistycznych.

5.4.4. Weryfikacja zdolności laboratorium do realizacji określonej metody (ISO 17025 punkt

5.4.2. paragraf drugi, ostatnie zdanie)

Weryfikacja jest procesem wymaganym w celu dostarczenia obiektywnego dowodu, że laboratorium jest kompetentne w zakresie stosowania wybranej, w pełni zwalidowanej metody w zamierzonym celu.

5.4.4.1. Proces weryfikacji metod innych niż te oparte na technikach morfologicznych i morfometrycznych

Informacje ogólne

Weryfikacja dostarcza obiektywnego dowodu na to, że laboratorium jest kompetentne w zakresie realizacji w pełni zwalidowanej metody zgodnie z ustalonymi parametrami metody. Weryfikację można również przeprowadzić poprzez uczestnictwo w badaniach biegłości lub w ocenie działania metody, pod warunkiem że pozwoli to na spełnienie wymagań określonych w tabeli 1.

Tabela 1. Wskazówki dotyczące weryfikacji parametrów walidacyjnych metody

Cechy charakterystyczne metody	Metoda weryfikacji
Czułość analityczna	Dokonaj analizy co najmniej 8 próbek* na ustalonej granicy wykrywalności (dla wirusów, wiroidów i fitoplazm granica powinna być niska). Można to połączyć z powtarzalnością/odtwarzalnością.
Specyficzność analityczna	Wybierz kilka z najbardziej odpowiednich organizmów docelowych (np. różne szczepy) i organizmów nie będących docelowymi. Badania powinny być przeprowadzone na średnim poziomie obecności organizmów.
Powtarzalność	Wykonaj co najmniej 3 równoległe badania tego samego materiału na niskich poziomach obecności organizmu docelowego*.
Odtwarzalność	Jak dla powtarzalności, ale w różnych terminach, jeśli to możliwe przez różnych analityków, i jeśli jest to odpowiednie z użyciem różnego wyposażenia

*Można stosować sztuczne podpróbki utworzone z 1 próbki.

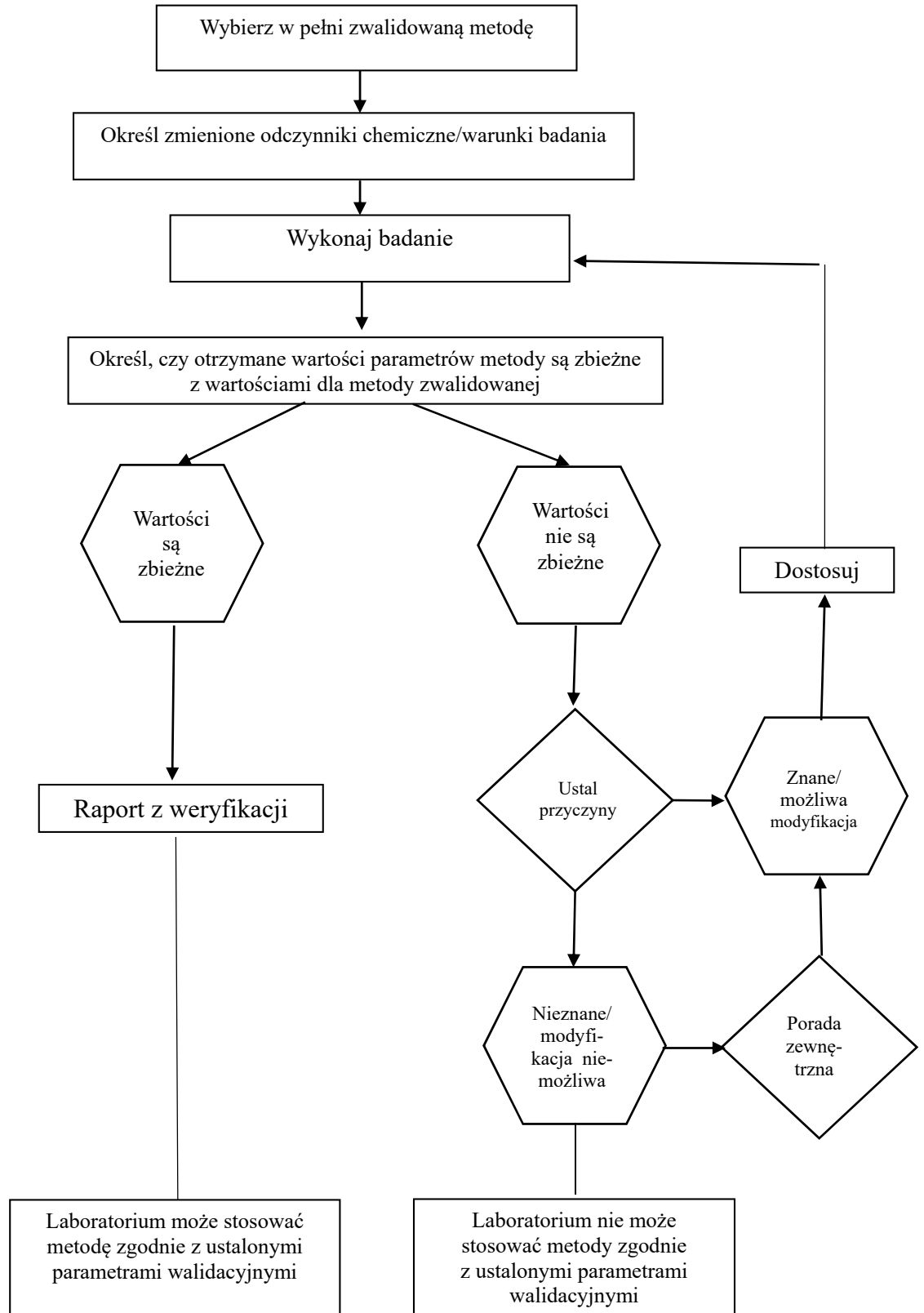
Informacje dodatkowe

Wybór odczynnika może być krytyczny dla możliwości metody. Zmiana odczynnika (lub partii odczynnika) lub dostawcy odczynnika może wpływać na możliwości metody. W takim przypadku weryfikacja działania odczynnika powinna być dokonana poprzez porównanie z odczynnikiem używanym poprzednio lub zgodnie z tabelą 1.

Proces weryfikacji

Ogólny opis procesu weryfikacji przedstawiono poniżej (patrz również Rysunek 2).

- Zrealizuj walidowaną metodę zgodnie z opisem lub z niewielkimi zmianami biorąc pod uwagę warunki lokalne (np. dostawcę odczynników lub wyposażenia, chyba że istnieją specjalne wymagania w tym zakresie w odniesieniu do walidowanej metody) w celu oszacowania, czy laboratorium spełnia wartości parametrów określone jako dane walidacyjne (patrz wskazówki w tabeli 1). Nie ma potrzeby weryfikowania selektywności.
- Jeśli odstępstwo od warunków opisanych dla walidowanej metody wpływa na wyniki badań, zbadaj przyczyny tego odstępstwa. Popraw, zweryfikuj metodę ponownie lub dokonaj rewalidacji jeśli jest wymagana, postępując zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale “Walidacja metod”. Jeśli wartości parametrów metody nie są odpowiednie, zbadaj czy nie jest to spowodowane mało istotnymi zmianami, które zostały wprowadzone do metody. Jeśli tak nie jest, zasięgnij wskazówek na zewnątrz (np. skontaktuj się z autorem metody). Metodę należy dostosować i pewne etapy powtórzyć. Jeśli zaobserwuje się inne przyczyny odstępstw (np. błędy personelu), należy podjąć działania korygujące i udokumentować je.
- Wyniki weryfikacji testu:
 - A) Wartości parametrów metody są zbieżne: laboratorium może stosować metodę rutynowo i należy sporządzić raport z weryfikacji, w którym stwierdza się, że wymagania są spełnione lub niespełnione. Korzystne jest zastosowanie formularza ‘Stwierdzenie weryfikacyjne’, którego wzór podano w Dodatku 4.
 - B) Wartości parametrów metody nie są zbieżne: laboratorium nie może stosować metody zgodnie z ustanowionymi parametrami walidacyjnymi.



Rysunek 2. Weryfikacja procesu

5.4.4.2. Proces weryfikacji metod morfologicznych i morfometrycznych

Laboratorium powinno potwierdzić, że jest w stanie prawidłowo stosować zwalidowaną metodę morfologiczną i/lub morfometryczną identyfikacji. Taką weryfikację można przeprowadzić również poprzez uczestnictwo w badaniach biegłości lub zidentyfikować w laboratorium pewną liczbę próbek, które następnie zostaną potwierdzone przez niezależnego eksperta.

5.4.5. Niepewność pomiaru (ISO 17025, punkt 5.4.6)

Laboratoria powinny starać się zidentyfikować wszystkie czynniki wpływające na niepewność metody, takie jak personel, wyposażenie i cechy biologiczne (tj. serotypy, patotypy). Informacji na temat poziomu niepewności wyników badania dostarczą wyniki badania powtarzalności i odtwarzalności. Jeśli możliwe, powinny być podjęte właściwe działania w celu skontrolowania tej niepewności. Jeśli nie są podejmowane żadne działania, należy udokumentować z jakiego powodu, a klient powinien zostać w pełni uświadomiony co do niepewności związanej z metodą.

Chociaż w większości przypadków metody stosowane w diagnostyce agrofagów dostarczają wyników jakościowych, takie jakościowe wyniki mogą opierać się na pomiarach (dane morfometryczne, liczenie komórek). Pomiarów takie mogą stanowić tylko jedną część procesu diagnostycznego, ale jeśli jest to krytyczne dla wyniku badania, powinna być oszacowana niepewność. W Dodatku 7 podano dwa przykłady raportów laboratorium ze zidentyfikowanymi punktami krytycznymi procesu.

5.5. Wyposażenie (ISO 17025, punkt 5.5)

Informacje są dostępne w rozdziale PM 7/84 o tym samym tytule.

5.6. Materiały odniesienia (ISO 17025, punkt 5.6.3.2.)

Informacje są dostępne w rozdziale PM 7/84 o tym samym tytule.

5.7. Pobieranie próbek (ISO 17025, punkt 5.7)

Informacje są dostępne w rozdziale PM 7/84 o tym samym tytule.

5.8. Postępowanie z próbkami (ISO 17025, punkt 5.8)

Informacje są dostępne w rozdziale PM 7/84 o tym samym tytule.

5.9. Zapewnienie jakości wyników (ISO 17025, punkt 5.9)

Informacje są dostępne w rozdziale PM 7/84 o tym samym tytule.

5.10. Przedstawianie wyników ISO 17025, punkt 5.10.3)

Informacje są dostępne w Standardzie EPPO PM 7/77 „Dokumentowanie i przedstawianie wyników”.

Literatura

AFNOR (1995). XP V03-111 *Agricultural and Food Products Analysis*. Protocol for the intra-laboratory evaluation of an alternative method of qualitative analysis against a reference method. Association Française de Normalisation, La Plaine Saint-Denis, FR.

EA (2008) EA-2/15 *Requirements for the Accreditation of Flexible Scopes*. http://www.eurolab.org/docs/EA/EA-2_15.pdf. [16 września 2009 r.] European Association for Accreditation.

EPPO (2007) Basic requirements for quality management in plant diagnostic laboratories. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 37, 580–588.

EPPO (2010) PM 7/76 (2) Use of EPPO diagnostic protocols. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 40, 350–352.

- EPPO (2006) PM 7/77 (1) Documentation and reporting on diagnosis. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**, 459–460.
- Hughes KJD, Griffin RL, Tomlinson JA, Boonham N, Inman AJ & Lane C (2006) Development of a one step real-time PCR assay for diagnosis of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* **96**, 975–981.
- ISO/ IEC (2005) *Standard 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Dostępny na www.iso.org. [30 stycznia 2014 r.].
- Petter F & Suffert M (2010) Survey on the use of tests mentioned in EPPO diagnostic protocols. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **40**, 5–22.
- ISO (2003) ISO 16140 Microbiology of food and animal feeding stuffs Protocol for the validation of alternative methods. Dostępny na www.iso.org [30 stycznia 2014 r.].

Dodatek 1 – Lista metod ujętych w protokołach diagnostycznych EPPO, które są szeroko stosowane

W oparciu o dane przekazane przez laboratoria, które wzięły udział w ankiecie EPPO poświęconej stosowaniu protokołów diagnostycznych EPPO, przeprowadzonej w 2007 i 2013 roku, metoda musiała być stosowana w co najmniej dwóch laboratoriach, w każdym laboratorium na co najmniej 8 próbkach, aby mogła być uznana za szeroko stosowaną. Proszę zauważyć, że metody molekularne obejmują ekstrakcję DNA.

Bakteriologia

PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*

- Rośliny bez objawów – bezpośrednia izolacja (na podłożach: CCT, King B i Lewan)
- Rośliny bez objawów – wzbogacony test DASI ELISA
- Rośliny bez objawów – wzbogacenie, a następnie konwencjonalny PCR
- Rośliny bez objawów – wzbogacenie, a następnie PCR (Bereswill *et al.*, 1992)
- Rośliny bez objawów – wzbogacenie, a następnie Real-time PCR (Gottsberger, 2010)
- Rośliny bez objawów – wzbogacenie, a następnie Real-time PCR (Pirc *et al.*, 2009)
- Rośliny bez objawów – izolacja wzbogacona (na podłożach King B i CCT)
- Rośliny bez objawów – izolacja, a następnie test aglutynacji
- Rośliny bez objawów – izolacja, a następnie test nadwrażliwości
- Rośliny bez objawów – izolacja, a następnie test IF
- Rośliny bez objawów – izolacja, a następnie test patogeniczności
- Rośliny z objawami – izolacja, następnie test aglutynacji
- Rośliny z objawami – izolacja, następnie testy biochemiczne
- Rośliny z objawami – bezpośrednia izolacja (na podłożach CCT, King B i Lewan)
- Rośliny z objawami – metoda sekwencjonowania DNA
- Rośliny z objawami – wzbogacony test DASI ELISA
- Rośliny z objawami – izolacja wzbogacona (na podłożach King B lub CCT)
- Rośliny z objawami – analiza kwasów tłuszczowych
- Rośliny z objawami – test nadwrażliwości
- Rośliny z objawami – IF
- Rośliny z objawami – testy polowe
- Rośliny z objawami – Nested PCR (Llop *et al.*, 2000)
- Rośliny z objawami – test patogeniczności
- Rośliny z objawami – PCR (Bereswill *et al.*, 1992)
- Rośliny z objawami – PCR (Gottsberger, przyjęty za Obradovic *et al.*, 2007)
- Rośliny z objawami – PCR (Stoger *et al.*, 2006)
- Rośliny z objawami – PCR (Taylor *et al.*, 2001)
- Rośliny z objawami – Real-time PCR (Gottsberger, 2010)
- Rośliny z objawami – Real-time PCR (Pirc *et al.*, 2009)

PM 7/21 (1) *Ralstonia solanacearum*

- Izolacja nieselektywna
- Izolacja selektywna
- IF
- Test biologiczny
- PCR
- Określenie cech biochemicznych
- ELISA
- Test patogeniczności
- REP-PCR

PM 7/42 (2) *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*

- Próbobranie i testy przesiewowe sadzonek pomidora na obecność infekcji latentnej zgodnie z Dodatkiem 1
- Ekstrakt z nasion – posiew rozcieńczeń na podłoża nieselektywne
- Ekstrakt z nasion – posiew rozcieńczeń na podłoża półselektywne
- Próbkę nasion – konwencjonalny PCR (przyjęty za Pastrik i Rainy, 1999)
- Próbkę nasion – bezpośredni PCR z użyciem ekstraktu z nasion pozytywnego w teście IF (Pastrik i Rainy, 1999)
- Próbkę nasion – analiza kwasów tłuszczowych
- Próbkę nasion – IF
- Próbkę nasion – test patogeniczności
- Próbkę roślin z objawami – określenie cech biochemicznych
- Próbkę roślin z objawami – konwencjonalny PCR (przyjęty za Pastrik i Rainy, 1999)
- Próbkę roślin z objawami – posiew rozcieńczeń na podłoża nieselektywne
- Próbkę roślin z objawami – posiew rozcieńczeń na podłoża półselektywne
- Próbkę roślin z objawami – bezpośredni PCR z użyciem ekstraktu z nasion pozytywnego w teście IF (Pastrik i Rainy, 1999)
- Próbkę roślin z objawami – analiza kwasów tłuszczowych
- Próbkę roślin z objawami – IF
- Próbkę roślin z objawami – Test patogeniczności

PM 7/59 (1) *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

- IF
- FISH
- PCR (Pastrik, 2000)
- Posiew rozcieńczeń na MTNA lub RCP 88
- Test biologiczny
- Określenie cech biochemicznych
- Analiza kwasów tłuszczowych
- Test patogeniczności
- Real-time PCR

PM 7/60 (1) *Panthoea stewartii* ssp. *stewartii*

- Posiew rozcieńczeń
- IF
- Barwienie komórek
- Analiza kwasów tłuszczowych
- Ocena morfologii kolonii i określenie cech biochemicznych bakterii
- PCR (Coplin i Marjercak, 2002)

PM 7/65 (1) *Xanthomonas fragariae*

- DAS ELISA
- IF
- Izolacja – metoda 1
- PCR (Dodatek 2)
- Identyfikacja na podstawie cech biochemicznych i fizjologicznych – testy konwencjonalne
- Posiew rozcieńczeń po teście patogeniczności na liściach
- Analiza kwasów tłuszczowych
- Izolacja – metoda 2

PM 7/96 (1) *Xylohilus ampelinus*

- Testy biochemiczne
- Bezpośrednia izolacja z materiału wykazującego objawy chorobowe, na podłoża YPGA i/lub NA
- ELISA
- Ekstrakcja z liści z objawami
- Ekstrakcja z gałązek z objawami - metoda 1

- Real-time PRC Dreo *et al.* (2007)

PM 7/99 (1) *Clavibacter michiganensis* ssp. *insidiosus*

- Posiew rozcieńczeń ekstraktu z nasion na podłoże King B z dodatkiem cycloheximide
- Ekstrakcja z nasion
- IF na czystej kulturze

PM 7/102 (1) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

- Konwencjonalny PCR Tegli *et al.* (2002)
- Bezpośrednia izolacja na NBY i SSM
- Bezpośrednia izolacja na YPGA i SSM
- Ekstrakcja z nasion bez objawów metodą moczenia
- Określenie cech morfologicznych i biochemicznych czystej kultury
- Test patogeniczności – metoda A

PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) - powodujące bakteryjne plamy na pomidorze i słodkiej papryce

- Określenie cech biochemicznych
- DNA barcoding
- Ekstrakcja z nasion
- Ekstrakcja z roślin z objawami
- Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych
- Test nadwrażliwości
- IF na czystej kulturze
- Izolacja z nasion na podłoże CKTM
- Izolacja z nasion na podłoże NA
- Izolacja z nasion na podłoże YDC
- Izolacja z nasion na podłoże YPGA
- Izolacja z roślin z objawami na podłoże Wibrinka
- Izolacja z roślin z objawami na podłoże YGCA
- Test patogeniczności

Entomologia

PM 7/3 (2) *Thrips palmi* (Standard EPPO zastąpiony przez Załącznik 1 do ISPM 27)

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/11 (1) *Frankliniella occidentalis*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/12 (1) *Parasaissetia nigra*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/13 (1) *Trogoderma granarium*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/19 (1) *Helicoverpa armigera*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/38 (1) *Unaspis citri*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/35 (1) *Bemisia tabaci*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/36 (1) *Diabrotica virgifera*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/51 (1) *Aonidiella citrina*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/53 (1) *Liriomyza* spp.

- Identyfikacja morfologiczna
- PCR RFLP

PM 7/55 (1) *Rhizoecus hibisci*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/56 (1) *Scirtothrips aurantii*, *Scirtothrips citri* i *Scirtothrips dorsalis*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/71 (1) *Opogona sacchari*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/74 (1) *Popillia japonica*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/83 (1) *Rhynchophorus ferrugineus* i *Rhynchophorus palmarum*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/104 (1) *Ceratitis capitata*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/107 (1) *Rhagoletis completa*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/109 (1) *Epitrix cucumeris*, *E. similaris* i *E. tuberis*

- Identyfikacja morfologiczna

Mikologia

PM 7/15 (1) *Ciborinia camelliae*

- Identyfikacja morfologiczna *in vivo*

PM 7/17 (2) *Guignardia citricarpa*

- Konwencjonalny PCR (Bonants *et al.*, 2003)
- Izolacja na agarze wiśniowym
- Izolacja na agarze owsianym
- Izolacja na agarze ziemniaczanym
- Identyfikacja morfologiczna
- Real-time PCR (van Gent-Pelzer *et al.*, 2007)
- Sekwencjonowanie ITS 1 i 2 – po konwencjonalnym PCR (Bonants *et al.*, 2003)

PM 7/18 (2) *Monilinia fructicola*

- Konwencjonalny PCR (Ioos i Frey, 2000)
- Izolacja na agarze ziemniaczanym
- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/27 (1) *Puccinia horiana*

- Identyfikacja morfologiczna *in vivo*

PM 7/28 (1) *Synchytrium endobioticum*

- Wykrywanie sporangiów w glebie
- Identyfikacja morfologiczna
- Test biologiczny w celu wyrejestrowania pola
- Identyfikacja patotypu – test polowy
- Identyfikacja patotypu – metoda Glynne-Lemmerzahl
- Identyfikacja patotypu – metoda Spieckermanna

PM 7/29 (2) *Tilletia indica*

- metoda obmywania niezaprawionych nasion
- Izolacja i podkiełkowanie teliospor na agarze wodnym
- Identyfikacja morfologiczna
- metoda obmywania zaprawionych nasion

PM 7/45 (1) *Cryphonectria parasitica*

- Izolacja
- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/66 (1) *Phytophthora ramorum*

- Izolacja z materiału roślinnego na agarze warzywnym V8
- Izolacja z materiału roślinnego na P5ARP
- Izolacja z materiału roślinnego na P5ARP[H]
- Izolacja z gleby na P5ARP[H]
- Izolacja z wody na P5ARP[H]
- Konwencjonalny PCR (Wagner i Werres, 2003)
- Konwencjonalny PCR (Kox *et al.*, 2002)
- Konwencjonalny PCR (Lane *et al.*, 2003)
- Izolacja z materiału roślinnego na agarze z sokiem marchwiowym (Kröber, 1985)
- Izolacja z materiału roślinnego na agarze wiśniowym
- Izolacja z materiału roślinnego na agarze marchwiowym (CPA; Werres *et al.*, 2001)
- Izolacja z materiału roślinnego na ciemnym agarze marchwiowym
- Izolacja z materiału roślinnego na PARB[H]
- Izolacja z materiału roślinnego na SNA
- Test z liściem rododendrona dla próbek gleby i wody (Themann *et al.*, 2002) w połączeniu z izolacją na CPA (Werres *et al.*, 2001)
- Real-time PCR (Hayden *et al.*, 2004)
- Real-time PCR (Hughes *et al.*, 2005)
- Sekwencjonowanie regionu ITS

PM 7/85 (1) *Plasmopara halstedii*

- Test biologiczny
- Konwencjonalny PCR w nasionach (Ioos *et al.*, 2007)

PM 7/86 (1) *Diaporthe vaccini*

- Identyfikacja morfologiczna *in vitro* na MEA
- Identyfikacja morfologiczna *in vitro* na PDA
- Identyfikacja morfologiczna *in vivo*

PM 7/91 (1) *Gibberella circinata*

- Identyfikacja w tkance roślinnej, z wyjątkiem nasion, techniką real-time PCR z podwójnie znakowaną sondą (Ioos *et al.*, 2009)
- Identyfikacja czystych kultur za pomocą konwencjonalnego lub SyBR green real-time PCR (Schweigkofler *et al.*, 2004)
- Identyfikacja w nasionach za pomocą konwencjonalnego lub SyBR green real-time PCR (Schweigkofler *et al.*, 2004)
- Identyfikacja w nasionach techniką real-time PCR z podwójnie znakowaną sondą (Ioos *et al.*, 2009)

- Izolacja z tkanki roślinnej, z wyjątkiem nasion, na DCPA
- Izolacja z tkanki roślinnej, z wyjątkiem nasion, na PDAS
- Izolacja z nasion na DCPA i przeniesienie na PDA i SNA
- Izolacja z nasion na podłoże Komada i przeniesienie na PDA i SNA
- Identyfikacja morfologiczna czystej kultury

PM 7/92 (1) *Gremmeniella abietina*

- Identyfikacja morfologiczna *in vitro* na innych wzbogaconych podłożach agarowych
- Identyfikacja morfologiczna *in vivo*

PM 7/93 *Melampsora medusae*

- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/111 (1) *Fusarium foetens*

- Izolacja z roślin z objawami na SNA z dodatkiem antybiotyków, a następnie posiew na podłoża półselektywne

PM 7/112 (1) *Phytophthora kernoviae*

- Test pułapkowy w glebie
- Test pułapkowy w wodzie
- Konwencjonalny PCR Schlenzig (2011)
- Izolacja na CPA
- Izolacja na półselektywnym agarze V8
- Identyfikacja morfologiczna
- Real-time PCR ukierunkowany na region białek ras (Ypt 1) Schena *et al.* (2006)
- Indukcja sporulacji Julius Kühn Institute
- Metoda ukierunkowana na region ITS Hugues *et al.* (2011)

Nematologia

PM 7/4 (3) *Bursaphelenchus xylophilus*

- Ekstrakcja metoda Baermann
- ITS RFLP PCR Burgermeister *et al.* (2009)
- Identyfikacja morfologiczna

PM 7/40 (3) *Globodera rostochiensis* i *Globodera pallida*

- Test biologiczny (test biologiczny A – metoda stosowana w Niemczech i Austrii)
- Test biologiczny (test reprodukcyjny A – metoda stosowana w Norwegii)
- Ekstrakcja butelkowa i z paskami bibuły
- Ekstrakcja z zastosowaniem metody Fenwicka
- Ekstrakcja z zastosowaniem wirówki Schuilinga
- Ekstrakcja metodą Seinhorsta
- Ekstrakcja z zastosowaniem płuczki z Wye
- Test nad wylęganiem osobników młodocianych z jaj A (metoda stosowana w Norwegii)
- Test nad wylęganiem osobników młodocianych z jaj C (metoda stosowana we Francji)
- Identyfikacja morfologiczna i morfometryczna
- Multiplex PCR (Bulman i Marshall, 1997)
- Test na żywotność (określanie wizualne)

PM 7/41 (2) *Meloidogyne chitwoodi* i *Meloidogyne fallax*

- Ekstrakcja z korzeni metodą inkubacji
- Ekstrakcja z korzeni metodą maceracji/inkubacji/wymywania Coolen (1979)
- Ekstrakcja z gleby metodą Baermann
- Ekstrakcja z gleby - dla dużych ilości, zaadaptowana metoda Baermann
- Ekstrakcja z bulw (trawienie enzymatyczne) Araya i Casweel-Chen (1993)

- Ekstrakcja z bulw (tkanka zmiksowana w blenderze) na sitach ekstrakcyjnych lub drogą wymywania (Viaene *et al.*, 2007)
- Morfologia
- PCR RFLP Zijlstra *et al.* (1997)
- PCR Wishart *et al.* (2002)
- PCR Zijlstra *et al.* (2000)
- Real-time (TaqMan) PCR, Zijlstra i van Hoof (2006)

PM 7/87 (1) *Ditylenchus destructor* i *Ditylenchus dipsaci*

- Ekstrakcja z gleby
- Ekstrakcja *D. dipsaci* z nasion
- Identyfikacja morfologiczna i morfometryczna

PM 7/88 (1) *Radopholus similis*

- Ekstrakcja z materiału roślinnego
- Ekstrakcja z gleby
- Identyfikacja morfologiczna i morfometryczna

PM 7/89 (1) *Heterodera glycines*

- Identyfikacja morfologiczna i morfometryczna

PM 7/94 (1) *Hirschmaniella* spp.

- Ekstrakcja z korzeni
- Ekstrakcja z gleby
- Identyfikacja morfologiczna i morfometryczna

PM 7/95 (1) *Xiphinema americanum sensu lato*

- Ekstrakcja z gleby
- Identyfikacja morfologiczna i morfometryczna

PM 7/103 (1) *Meloidogyne enterolobii*

- Ekstrakcja z korzeni
- Ekstrakcja z gleby
- Identyfikacja morfologiczna i morfometryczna

Fitoplazmologia

PM 7/62 (1) *Candidatus Phytoplasma mali*

- Zdrewniałe rośliny wskaźnikowe
- ELISA
- Uniwersalny PCR (Lorenz *et al.*, 1995)
- Uniwersalny PCR (Lee *et al.*, 1998)
- PCR specyficzny dla grupy AP- lub 16SrX (Lorenz *et al.*, 1995)
- PCR specyficzny dla grupy AP- (Jaraush *et al.*, 1995)

PM 7/63 (1) *Candidatus Phytoplasma pyri*

- Uniwersalny PCR (Lorenz *et al.*, 1995)
- Uniwersalny PCR (Lee *et al.*, 1998)

PM 7/79 (1) *Grapevine flavescence doree phytoplasma*

- Multiplex nested-PCR (do równoczesnego wykrywania flavescence doree i bois noir)
- Bezpośredni generic PCR, nested generic PCR, RFLP
- Bezpośredni generic PCR, a następnie nested group-specific PCR

Wirusologia

PM 7/30 (2) *Beet necrotic yellow vein benyvirus*

- ELISA

PM 7/31 (1) *Citrus tristeza closterovirus*

- DAS-ELISA
- Tissue print-ELISA

PM 7/32 (1) *Plum pox potyvirus*

- testy biologiczne (inokulacja zdrewniałych roślin wskaźnikowych)
- DAS-ELISA z 5B-IVIA lub przeciwciałami poliklonalnymi
- IC-RT-PCR
- Co-PCR
- DASI-ELISA z 5B-IVIA lub uniwersalnymi przeciwciałami monoklonalnymi

PM 7/33 (1) *Potato spindle tuber pospiviroid*

- DIG probe
- R-PAGE
- RT-PCR
- TaqMan

PM 7/34 (1) *Tomato spotted wilt virus, Impatiens necrotic spot virus i Watermelon silver mottle virus*

- Mechaniczna inokulacja roślin wskaźnikowych
- TAS-ELISA
- RT-PCR
- Wykrywanie TSWV w roślinach i pojedynczych wciornastkach z użyciem real-time fluorescent RT-PCR (TaqMan)
- Test polowy

PM 7/50 (1) *Tomato yellow leaf curl i Tomato mottle begomoviruses*

- TAS-ELISA
- Test PCR 1 (Accotto *et al.*, 2000)
- technika ekstrakcji DNA 1 (Accotto *et al.*, 2000)
- PCR/MPCR, Deng *et al.*, 1994

PM 7/67 (1) *American plum line pattern virus (Ilarvirus)*

- DAS-ELISA (Clarks i Adams, 1977)
- Zdrewniałe rośliny wskaźnikowe

PM 7/113 (1) *Pepino mosaic virus*

- Test biologiczny – mechaniczna inokulacja ekstraktem z liści lub owoców
- Test biologiczny - mechaniczna inokulacja ekstraktem z nasion
- DAS-ELISA
- Ekstrakcja z nasion
- Real-time PCR Ling *et al.* (2007)

Dodatek 2 – Procedura walidacji metody (A) poprzez porównanie ze zwalidowaną metodą (B)

Porównanie metody (A) ze zwalidowaną metodą (B) może stanowić odpowiednią procedurę walidacji, w sytuacjach gdy poziom czułości analitycznej lub specyficzności analitycznej zwalidowanej metody (B) są uznawane za odpowiednie, oraz gdy metoda (A) prezentuje korzyści (np. szybkość, łatwość stosowania).

Uznaje się, że metoda (A) może wykazywać wyższy poziom czułości lub specyficzności niż zwalidowana metoda (B) i porównanie metod dostarczy jedynie informacji, że czułość lub specyficzność metody (A) jest co najmniej na poziomie określonym dla zwalidowanej metody (B).

Powinna być również oceniona powtarzalność i odtwarzalność metody (A) (Dodatek 5).

Porównanie metody (A) ze zwalidowaną metodą (B) powinno być przeprowadzone w następujący sposób:

Wykonaj 3 powtórzenia z organizmem docelowym i 3 powtórzenia z każdym z organizmów nie będących docelowymi, jak wskazano w tabeli 2. Próbkę są badane równoległe z zastosowaniem tych 2 metod.

Liczba próbek wskazana w tej tabeli została określona poprzez porównanie z opublikowanymi standardami, np. ISO 16140 *Mikrobiologia żywności i pasz. Protokół walidacji metod alternatywnych* (ISO, 2003) oraz AFNOR XP V03-111 *Analiza produktów rolnych i żywnościowych. Protokół wewnętrznlaboratoryjnej oceny alternatywnej metody analizy jakościowej w odniesieniu do metody referencyjnej* (AFNOR, 1995).

Korelacja pomiędzy wynikami uzyskanymi z zastosowaniem zwalidowanej metody (B) i metody (A) powinna być oceniona dla różnych poziomów obecności agrofaga. Wyniki mogą być przedstawione jak podano w tabeli 3 wraz z kalkulacją względnych parametrów metody.

Tabela 2. Minimalna liczba próbek wymagana do porównania metody (A) ze zwalidowaną metodą (B).

Rodzaj materiału	Poziom obecności organizmu		
	Niski/niski (stosunkowo*)	Średni/średni (stosunkowo*)	Wysoki/wysoki (stosunkowo*)
Izolaty czystych kultur organizmu docelowego lub próbki sfortyfikowane organizmem docelowym	10	7	5
Izolaty czystych kultur organizmów nie będących docelowymi lub próbki sfortyfikowane organizmami nie będącymi docelowymi	-	22-44	-
Próbka naturalnie porażona organizmem docelowym	Właściwe serie rozcieńczeń są przygotowywane z użyciem 15 próbek pozytywnych, uprzednio zidentyfikowanych z użyciem zwalidowanej metody (B), do uzyskania granicy wykrywalności zwalidowanej metody (B).		

* w odniesieniu do wirusologii i fitoplazmologii

Całkowita liczba próbek organizmu docelowego nie może przekraczać podwójnej liczby próbek organizmu nie będącego organizmem docelowym.

Tabela 3. Przykładowe wyniki korelacji pomiędzy zwalidowaną metodą (B) i metodą (A)

	Zwalidowana metoda (B)			
		+	-	Suma
Metoda (A)	+	69	3	72
	-	6	12	18
Suma		75	15	90

Tabelę 3 przyjęto za Hughes *et al.*, 2006. Liczby podane w tabeli są przykładowe. PA (dodatnia zgodność), PD (dodatnia niezgodność), ND (ujemna niezgodność), NA (ujemna zgodność). Wyniki pozytywne (+) i negatywne (-) dla 90 próbek badanych z zastosowaniem obydwu metod, ilustrujące czułość diagnostyczną $PA/(PA+ND)$, specyficzność diagnostyczną $NA/(NA+PD)$ i względną dokładność $(PA+NA)/(PA+PD+ND+NA)$. Czułość diagnostyczna = 92%; specyficzność diagnostyczna = 80%; względna dokładność = 90%.

Dodatek 3 - Stwierdzenie walidacyjne

Nazwa metody:

Zakres metody:

Komentarz dodatkowy:

Dokumentacja dotycząca przydatności metody i wymagań jakie metoda powinna spełniać są dostępne w laboratorium. Dokumentacja obejmuje książki laboratoryjne i inne informacje jak pokazano poniżej, które wskazują w jaki sposób przeprowadzono walidację w tym badaniu.

Parametry walidacyjne metody	A	B	C	D	Miejsce przechowywania dokumentacji
Czułość analityczna					
Specyficzność analityczna					
Selektywność (o ile jest to odpowiednie)					
Powtarzalność					
Odtwarzalność					

A = dane z własnych eksperymentów laboratorium

B = dane z porównań międzylaboratoryjnych

C = informacje od producenta

D = informacje ze źródeł zewnętrznych (literatura itp.)

Inne informacje (opcjonalnie)

Miejsce przechowywania dokumentacji

Czułość diagnostyczna
Specyficzność diagnostyczna
Odporność (informacje podano z p. 5.4.3)

Na podstawie powyższego stwierdzenia walidacyjnego uznaje się, że metoda jest przydatna do zastosowania w zamierzonym celu.

Osoba odpowiedzialna za przeprowadzenie badania

Nazwisko dużymi literami:

Podpis:

Data:

Osoba autoryzująca

Nazwisko dużymi literami:

Podpis:

Data:

Dodatek 4 – Stwierdzenie weryfikacyjne

Nazwa metody:

Wytypowana w pełni zwalidowana metoda:

Zakres w pełni zwalidowanej metody:

Opis zmian:

Dokumentacja dotycząca weryfikacji metody i wymagań, jakie metoda powinna spełniać są dostępne w laboratorium. Dokumentacja obejmuje książki laboratoryjne i inne informacje, które wskazują w jaki sposób przeprowadzono weryfikację w tym badaniu.

Parametry walidacyjne metody	Uzyskane parametry walidacyjne metody	Spełnia wymagania dla w pełni zwalidowanej metody tak/nie	Miejsce przechowywania dokumentacji
Czułość analityczna Specyficzność analityczna Powtarzalność Odtwarzalność			

Na podstawie powyższego stwierdzenia weryfikacyjnego uznaje się, że metoda jest przydatna do zastosowania w zamierzonym celu.

Osoba odpowiedzialna za przeprowadzenie badania
Nazwisko dużymi literami:

Podpis:

Data:

Osoba autoryzująca
Nazwisko dużymi literami:

Podpis:

Data:

Dodatek 5 – Tabele zawierające szczegółowe wskazówki dotyczące procesu walidacji z podziałem na dziedziny (bakteriologia, botanika, entomologia, mikologia, nematologia oraz wirusologia i fitoplazmologia)

Wskazówki dotyczące stosowania tabel

Komentarz dotyczący liczb

Liczby podane w poniższych tabelach wynikają z doświadczenia ekspertów z paneli EPPO zajmujących się diagnostyką, związanego z walidacją metod. W zależności od kombinacji agrofag/roślina mogą być możliwe lub niezbędne odstępstwa od poniższych wytycznych. Walidacja metod morfologicznych i morfometrycznych dla wszystkich dyscyplin jest opisana w Dodatku 6.

Ogólna uwaga dotycząca czułości analitycznej

Zawsze jeśli jest to możliwe, należy ustalić granicę wykrywalności metody (jak określono w standardzie PM 7/76). Niemniej jednak, granicę tę nie zawsze można bezwzględnie określić przy wykrywaniu agrofagów. Istnieją organizmy, których nie można wyhodować (patogeny obligatoryjne), takie których nie można policzyć (grzyby), które są obecne tylko w roślinie, lub których nie można wyizolować (np. fitoplazmy). Z tego powodu nie można dokładnie ustalić koncentracji tych organizmów lub jest to prawie niemożliwe, stąd w takich przypadkach stosuje się szacowanie. Nawet w przypadku takich organizmów, które dają się wyizolować (wiele bakterii i wirusów), koncentracja może być jedynie oszacowana (np. jednostki tworzące kolonie lub mg/ml). Szacowania takiego dokonuje się często na podstawie pośredniego pomiaru. Tam gdzie ma to zastosowanie, należy wykonać rozcieńczenia seryjne aż do uzyskania punktu końcowego.

Ogólna uwaga dotycząca powtórzeń

Liczba powtórzeń (podana w tabelach poniżej) nie odnosi się do liczby technicznych powtórzeń (np. podwójne czy potrójne reakcje, które są przeprowadzane standardowo w teście ELISA czy teście real-time PCR).

Bakteriologia

Tabela 4. Bakteriologia (skorzystaj również ze wskazówek dotyczących stosowania tabel)

Technika ekstrakcji docelowego organizmu z matrycy (izolacja docelowego organizmu)

Ekstrakcja jest zawsze walidowana w metodzie.

Czułość analityczna	Technika powinna pozwolić na wyekstrahowanie/wyzolowanie odpowiedniej ilości organizmu docelowego, tak by umożliwić jego hodowlę, a następnie dalszą analizę. Dokonaj ekstrakcji z co najmniej 3 próbek na wysokim/średnim/niskim poziomie obecności organizmu docelowego. Próbki mogą składać się z jawnie porażonego materiału (diagnostyka) lub mogą być przygotowane przez dodanie do materiału stanowiącego próbkę porażonego materiału zawierającego bakterie docelowe o znanej koncentracji (wykrywanie porażenia utajonego lub kontaminacji).
Specyficzność analityczna	Parametr ten nie ma zastosowania. Ekstrakcja docelowego organizmu z próbki z definicji nie jest specyficzna.
Selektywność	Parametr ten nie ma zastosowania. Ekstrakcja docelowego organizmu z próbki z definicji nie jest selektywna.
Powtarzalność	Zastosuj co najmniej jedną próbkę o niskiej koncentracji organizmu docelowego i sporządź co najmniej trzy podróbki (ekstrakty). Oszacuj efektywność ekstrakcji odpowiednią metodą. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy wykonać ekstrakcję na dodatkowych próbkach.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach, z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Techniki molekularne, np. PCR, real time PCR, LAMP

Ten etap obejmuje również techniki izolacji DNA z materiału stanowiącego próbkę.

Czułość analityczna	Dokonaj analizy co najmniej 3 serii sfortyfikowanych ekstraktów próbki w zakresie 10^1 - 10^6 komórek docelowego organizmu w ml. Preferowanym sposobem jest wykonanie dziesięciokrotnych rozcieńczeń zawiesiny komórek docelowej bakterii w ekstraktach z próbki. Określ najniższą gęstość komórek, przy której wynik jest pozytywny. Jeśli po wykonaniu 3 serii nie uzyska się zgodnych wyników, należy przygotować i przebadać dodatkowe serie. Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów metody, które powinny być skrupulatnie określone i wystandaryzowane, np. rodzaj odczynników do PCR (w szczególności polimerazy DNA) i warunki cyklu PCR.
Specyficzność analityczna	Dokonaj analizy (i) szczepów docelowej bakterii różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz (ii) zestawu bakterii nie będących docelowymi, w szczególności tych związanych z materiałem stanowiącym próbkę. Użyj zawiesiny bakterii z czystej kultury o gęstości średnio 10^6 komórek w ml. Dla organizmów innych niż docelowe, stężenie kwasów nukleinowych powinna być wystarczająco wysoka, by zmaksymalizować możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych, ale na realnym poziomie. Dodatkowo, wyniki badania mogą być uzupełnione przez porównanie <i>'in silico'</i> sekwencji sond/primerów z sekwencjami z bibliotek genowych.
Selektywność	Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. zastosowanie różnych roślin żywicielskich należących do tej samej rodziny, różnych odmian rośliny żywicielskiej), mają wpływ na działanie metody.
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń sfortyfikowanych ekstraktów próbki o niskiej koncentracji. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Tabela 4. Ciąg dalszy

Techniki serologiczne: IF, ELISA	
Czułość analityczna	Dokonaj analizy co najmniej 3 serii sfortyfikowanych ekstraktów próbki w zakresie 10^2 - 10^6 komórek docelowego organizmu w ml. Preferowanym sposobem jest wykonanie dziesięciokrotnych rozcieńczeń zawiesiny komórek docelowej bakterii w ekstraktach z próbki. Określ najniższą gęstość komórek, przy której wynik jest pozytywny przy rozcieńczeniu roboczym przeciwciał/antygeny. Jeśli po wykonaniu 3 serii nie uzyska się zgodnych wyników, należy przygotować i przebadać dodatkowe serie. Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów metody, które powinny być skrupulatnie określone i wystandaryzowane, np. liczba przegłędanych pól widzenia mikroskopu w teście IF i wartość progowa gęstości optycznej (OD) w teście ELISA.
Specyficzność analityczna	Określ specyficzność przeciwciał z użyciem (i) szczepów docelowej bakterii różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz (ii) zestawu bakterii nie będących docelowymi, w szczególności tych związanych z materiałem stanowiącym próbkę. Użyj zawiesiny bakterii z czystej kultury o gęstości średnio 10^6 komórek w ml i przeciwciał/antygeny w rozcieńczeniu roboczym.
Selektywność	Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. zastosowanie różnych roślin żywicielskich należących do tej samej rodziny, różnych odmian rośliny żywicielskiej), mają wpływ na działanie metody.
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń sfortyfikowanych ekstraktów próbki o niskiej koncentracji. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.
Techniki hodowlane: selektywna izolacja	
Czułość analityczna	Dokonaj analizy co najmniej 3 serii sfortyfikowanych ekstraktów próbki w zakresie 10 - 10^6 komórek docelowego organizmu w ml. Preferowanym sposobem jest wykonanie dziesięciokrotnych rozcieńczeń zawiesiny komórek docelowej bakterii w ekstraktach z próbki. Określ najniższą gęstość komórek, przy której wynik jest pozytywny. Jeśli po wykonaniu 3 serii nie uzyska się zgodnych wyników, należy przygotować i przebadać dodatkowe serie. Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów metody, które powinny być skrupulatnie określone i wystandaryzowane, np. rodzaj odczynników do przygotowania podłoża (w szczególności antybiotyków i odczynników do przygotowania roztworu wyjściowego) oraz warunki inkubacji.
Specyficzność analityczna	Określ specyficzność podłoża hodowlanego z użyciem (i) szczepów docelowej bakterii różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz (ii) zestawu bakterii nie będących docelowymi, w szczególności tych związanych z materiałem stanowiącym próbkę. Użyj zawiesiny bakterii o gęstości średnio 10^6 komórek w ml i dokonaj analizy drogą rozcieńczeń płytkowych.
Selektywność	Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. zastosowanie różnych roślin żywicielskich należących do tej samej rodziny, różnych odmian rośliny żywicielskiej), mają wpływ na działanie metody.
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń sfortyfikowanych ekstraktów próbki o niskiej koncentracji. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Tabela 4. Ciąg dalszy

Testy biologiczne: selektywne wzbogacanie w roślinie żywicielskiej	
Czułość analityczna	<p>Dokonaj analizy co najmniej 3 serii sfortyfikowanych ekstraktów próbki w zakresie 10^2 - 10^6 komórek docelowego organizmu w ml.</p> <p>Preferowanym sposobem jest wykonanie dziesięciokrotnych rozcieńczeń zawiesiny komórek docelowej bakterii w ekstraktach z próbki. Określ najniższą gęstość komórek, przy której wynik jest pozytywny. Oznacza to izolację z roślin testowych wykazujących objawy porażenia lub bez objawów.</p> <p>Jeśli po wykonaniu 3 serii nie uzyska się zgodnych wyników, należy przygotować i przebadać dodatkowe serie.</p> <p>Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów metody, które powinny być skrupulatnie określone i wystandaryzowane, np. stadium rośliny testowej, metoda inokulacji i warunki inkubacji</p>
Specyficzność analityczna	<p>Określ specyficzność testu biologicznego z użyciem (i) szczepów docelowej bakterii różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz (ii) zestawu bakterii nie będących docelowymi, w szczególności tych związanych z materiałem stanowiącym próbkę.</p> <p>Użyj zawiesiny bakterii z czystej kultury o gęstości średnio 10^6 komórek w ml.</p>
Selektywność	<p>Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. zastosowanie różnych odmian roślin żywicielskich, łącznie z najbardziej podatnymi odmianami), mają wpływ na działanie metody.</p>
Powtarzalność	<p>Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń ekstraktów próbki o niskiej koncentracji i użyj roślin żywicielskich ustalonych przy ocenie specyficzności. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.</p>
Odtwarzalność	<p>Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.</p>
Test patogeniczności	
Czułość analityczna	<p>Parametr ten nie ma zastosowania w odniesieniu do testu patogeniczności, który z reguły jest wykonywany z użyciem zawiesiny bakterii o gęstości 10^6 komórek w ml. Jednakże, czułość analityczna może być brana pod uwagę, jeśli inokulowane są rośliny żywicielskie w różnych stadiach rozwojowych.</p>
Specyficzność analityczna	<p>Określ specyficzność testu patogeniczności z użyciem zestawu szczepów docelowej bakterii różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz zestawu bakterii nie będących docelowymi, w szczególności tych związanych z materiałem stanowiącym próbkę.</p> <p>Użyj zawiesiny bakterii o gęstości średnio 10^6 komórek w ml.</p> <p>Wystąpienie objawów i reizolacja docelowej bakterii (postulaty Kocha) oznacza wynik pozytywny.</p>
Selektywność	<p>Określ, czy zastosowanie różnych odmian rośliny żywicielskiej ma wpływ na działanie metody.</p>
Powtarzalność	<p>Dokonaj analizy 3 powtórzeń zestawu szczepów docelowej bakterii wykazujących zmienność w testach identyfikacyjnych i w zakresie wirulencji. Użyj zawiesiny o gęstości średnio 10^6 komórek w ml.</p> <p>Wystąpienie objawów i reizolacja docelowej bakterii (postulaty Kocha) oznacza wynik pozytywny.</p>
Odtwarzalność	<p>Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i na różnym wyposażeniu, o ile ma to zastosowanie.</p>

Tabela 4. Ciąg dalszy

Techniki fingerprint: profil białkowy, profil kwasów tłuszczowych i profil DNA	
Czułość analityczna	Określ minimalną ilość bakterii zebranych z określonych podłoży hodowlanych umożliwiającą przeprowadzenie wiarygodnej analizy. Parametry metody powinny być precyzyjnie określone i wystandaryzowane, np. podłoże hodowlane, stadium kultury odpowiednie do zebrania komórek.
Specyficzność analityczna	Określ specyficzność techniki fingerprint z użyciem (i) szczepów docelowej bakterii różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz (ii) zestawu bakterii nie będących docelowymi, w szczególności związanych z materiałem stanowiącym próbkę. Zapewnij markery do rozróżniania podgatunków i patowarów. Dodatkowo, wyniki badania mogą być uzupełnione przez porównanie „ <i>in silico</i> ” z danymi dostępnymi w odpowiednich bazach danych.
Selektywność	Nie ma zastosowania.
Powtarzalność	Dokonaj analizy 3 powtórzeń ekstraktu białek/kwasów tłuszczowych/DNA.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Botanika

Tabela 5. Botanika (skorzystaj również ze wskazówek dotyczących stosowania tabel)

Technika ekstrakcji docelowego organizmu z matrycy	
Ekstrakcja jest zawsze walidowana poprzez badanie.	
Czułość analityczna	Technika powinna pozwolić na wyekstrahowanie odpowiedniej ilości organizmu docelowego, tak by umożliwić jego dalszą analizę. Procent nasion roślin obcych gatunków inwazyjnych, wykrywalny metodą ekstrakcji, może być określony na podstawie badania co najmniej 3 próbek.
Specyficzność analityczna	Parametr ten nie ma zastosowania. Ekstrakcja docelowego organizmu z próbki z definicji nie jest specyficzna.
Selektywność	Parametr ten nie ma zastosowania. Ekstrakcja docelowego organizmu z próbki z definicji nie jest selektywna.
Powtarzalność	Zastosuj co najmniej jedną próbkę o niskiej koncentracji organizmu docelowego i sporządź co najmniej trzy podróbki (ekstrakty). Oceń efektywność ekstrakcji za pomocą właściwej metody badawczej. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy poddać ekstrakcji dodatkowe próbki.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Entomologia

Tabela 6. Entomologia (skorzystaj również ze wskazówek dotyczących stosowania tabel)

Technika ekstrakcji docelowego organizmu z matrycy

Ekstrakcja jest zawsze walidowana poprzez badanie.

Czułość analityczna	Technika powinna pozwolić na wyekstrahowanie odpowiedniej ilości organizmu docelowego, tak by umożliwić jego dalszą analizę. Procent owadów wykrywalny metodą ekstrakcji, może być określony na podstawie badania co najmniej 3 próbek. Ekstrakcja DNA: walidacja jest zawarta w części dotyczącej walidacji metod molekularnych.
Specyficzność analityczna	Parametr ten nie ma zastosowania. Ekstrakcja docelowego organizmu z próbki z definicji nie jest specyficzna.
Selektywność	Parametr ten nie ma zastosowania. Ekstrakcja docelowego organizmu z próbki z definicji nie jest selektywna.
Powtarzalność	Nie ma zastosowania.
Odtwarzalność	Nie ma zastosowania.

Techniki molekularne, np. PCR, real-time PCR, LAMP

Ten etap obejmuje również techniki izolacji DNA z materiału stanowiącego próbkę

Czułość analityczna	Przygotuj odpowiednią liczbę osobników. Liczba ta jest zmienna, w zależności od rodzaju, gatunku i stadium rozwojowego. Określ najmniejszą liczbę osobników lub części osobników, która ma być wykryta. Przeprowadź co najmniej 3 eksperymenty. Jeśli po wykonaniu 3 serii nie uzyska się zgodnych wyników, należy przygotować i przebadać dodatkowe serie. Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów metody, które powinny być skrupulatnie określone i wystandaryzowane, np. rodzaj odczynników do PCR (w szczególności polimerazy DNA) i warunki cyklu PCR.
Specyficzność analityczna	Dokonaj analizy (i) pewnej ilości organizmów docelowych różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz (ii) odpowiednich organizmów nie będących docelowymi, w szczególności tych związanych z materiałem stanowiącym próbkę. Dla organizmów innych niż docelowe, stężenie kwasów nukleinowych powinno być wystarczająco wysokie, by zmaksymalizować możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych, ale na realnym poziomie. Dodatkowo, wyniki badania mogą być uzupełnione przez porównanie <i>'in silico'</i> sekwencji sond/primerów z sekwencjami z bibliotek genowych.
Selektywność	Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. zastosowanie różnych odmian rośliny żywicielskiej) mają wpływ na działanie metody.
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń ekstraktów próbki o niskiej koncentracji. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Mikologia

Tabela 7. Mikologia (skorzystaj również ze wskazówek dotyczących stosowania tabel)

Technika ekstrakcji/izolacji/wyłapania docelowego organizmu z matrycy	
Ekstrakcja jest zawsze walidowana poprzez badanie.	
Czułość analityczna	Technika powinna pozwolić na wyekstrahowanie/wyizolowanie/wyłapanie wystarczającej ilości docelowego organizmu, tak by umożliwić jego hodowlę i dalszą analizę. Jeśli jest to możliwe, określ poprzez wymieszanie zdrowej i porażonej tkanki najniższą ilość chorej tkanki lub tkanki wykazującej cechy charakterystyczne, którą należy wyłożyć na pożywkę lub zidentyfikować w celu dokonania wiarygodnej analizy. Dokonaj ekstrakcji/izolacji/wyłapania docelowego organizmu z co najmniej 3 próbek (próbek porażonych naturalnie lub w sposób sztuczny). Może to obejmować procedurę obmywania i stosowanie membran do wyłapywania zarodników.
Specyficzność analityczna	Parametr ten nie ma zastosowania. Ekstrakcja docelowego organizmu z próbki z definicji nie jest specyficzna.
Selektywność	Parametr ten nie ma zastosowania. Ekstrakcja docelowego organizmu z próbki z definicji jest nieselektywna.
Powtarzalność	Użyj co najmniej jednej próbki z niską koncentracją docelowego organizmu i wykonaj 3 podpróbki (ekstraktów). Oceń efektywność ekstrakcji za pomocą właściwej metody badawczej. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać ekstrakcji dodatkowe próbki.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.
Techniki molekularne, np. PCR, real-time PCR, LAMP	
Uwaga. Ten etap obejmuje również metody izolacji DNA z materiału stanowiącego próbkę.	
Czułość analityczna	Określ minimalną ilość docelowego organizmu (np. liczba konidiów lub masa materiału porażonego w materiale zdrowym), z którego można uzyskać wykrywalną ilość DNA organizmu docelowego. Wykonaj co najmniej 3 eksperymenty z seryjnymi rozcieńczeniami, najlepiej w DNA rośliny żywicielskiej. Jeśli po wykonaniu 3 serii nie uzyska się zgodnych wyników, należy przygotować i przebadać dodatkowe serie. Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów metody, które powinny być skrupulatnie określone i wystandaryzowane, np. rodzaj odczynników do PCR (w szczególności polimerazy DNA) i warunki cyklu PCR.
Specyficzność analityczna	Dokonaj analizy (i) pewnej ilości organizmów docelowych różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz (ii) odpowiednich organizmów nie będących docelowymi (np. grzyby spokrewnione filogenetycznie), które mogą być obecne w próbce lub ekstrakcie z próbki. Dla organizmów innych niż docelowe, stężenie kwasów nukleinowych powinna być wystarczająco wysoka, by zmaksymalizować możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych, ale na realnym poziomie. Dodatkowo, wyniki badania mogą być uzupełnione przez porównanie <i>in silico</i> sekwencji sond/primerów z sekwencjami z bibliotek genowych.
Selektywność	Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. zastosowanie różnych odmian rośliny żywicielskiej) mają wpływ na działanie metody.
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń ekstraktów próbki o niskiej koncentracji. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Tabela 7. Ciąg dalszy

Techniki serologiczne: ELISA

Czułość analityczna	Określ minimalną ilość organizmu docelowego (np. liczba konidiów lub masa materiału porażonego w materiale zdrowym), dla której można uzyskać wynik pozytywny badania przy zastosowaniu rozcieńczenia roboczego surowicy/przeciwciała. Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów metody, które powinny być skrupulatnie określone i wystandaryzowane, np. wartość progowa. Jeśli po wykonaniu 3 serii nie uzyska się zgodnych wyników, należy przygotować i przebadać dodatkowe serie.
Specyficzność analityczna	Określ specyficzność przeciwciał z użyciem (i) szczepów organizmów docelowych różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz (ii) odpowiednich organizmów nie będących docelowymi, w szczególności tych związanych z materiałem stanowiącym próbkę.
Selektywność	Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. zastosowanie różnych odmian rośliny żywicielskiej) mają wpływ na działanie metody.
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń ekstraktów próbki o niskiej koncentracji. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Testy biologiczne: Test patogeniczności

Czułość analityczna	Określ ilość matrycy lub ekstraktu matrycy (np. ilość gramów liści, gleby) niezbędną do wywołania objawów chorobowych. Wykonaj 3 eksperymenty z 5 seriami rozcieńczeń. Jeśli po wykonaniu 3 serii nie uzyska się zgodnych wyników, należy przygotować i przebadać dodatkowe serie. Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów metody, które powinny być skrupulatnie zdefiniowane i wystandaryzowane, tj. stadium rośliny testowej, metoda inokulacji i warunki inkubacji.
Specyficzność analityczna	Określ specyficzność testu biologicznego z użyciem (i) szczepów docelowych grzybów różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym oraz (ii) zestawu grzybów nie będących docelowymi, w szczególności tych związanych z materiałem stanowiącym próbkę.
Selektywność	Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. zastosowanie różnych odmian rośliny żywicielskiej) mają wpływ na działanie metody
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń ekstraktów próbki o niskiej koncentracji i użyj roślin żywicielskich ustalonych w teście na specyficzność. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach, o ile ma to zastosowanie.

Nematologia

Tabela 8. Nematologia (skorzystaj również ze wskazówek dotyczących stosowania tabel)

Technika ekstrakcji docelowego organizmu z matrycy	
Ekstrakcja jest zawsze walidowana poprzez badanie.	
Czułość analityczna	Technika powinna pozwolić na wyekstrahowanie wystarczającej ilości docelowego organizmu, tak by umożliwić jego dalszą analizę. Procent nicieni wykrywalny metodą ekstrakcji może być określony na podstawie badania co najmniej 3 próbek.
Specyficzność analityczna	Parametr ten nie ma zastosowania. Ekstrakcja docelowego organizmu z próbki z definicji nie jest specyficzna.
Selektywność	Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. rodzaj gleby do ekstraktora cyst) mają wpływ na działanie metody.
Powtarzalność	Użyj co najmniej jednej próbki z niską koncentracją docelowego organizmu i wykonaj 3 podpróbki (ekstrakty). Oceń efektywność ekstrakcji za pomocą właściwej metody badawczej.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.
Techniki molekularne, np. PCR, real-time PCR, LAMP	
Etap ten obejmuje także techniki izolacji DNA z materiału stanowiącego próbkę.	
Czułość analityczna	Przygotuj odpowiednią liczbę osobników. Liczba ta jest zmienna i zależy od rodzaju, gatunku i stadium rozwojowego. Określ najmniejszą liczbę osobników lub części osobników, którą należy wykryć i zidentyfikować. Wykonaj co najmniej 3 eksperymenty. Jeśli po wykonaniu trzech serii nie uzyska się zgodnych wyników, należy przygotować i przebadać dodatkowe serie. Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów metody, które powinny być skrupulatnie zdefiniowane i wystandaryzowane, np. rodzaj odczynników do PCR (w szczególności polimeraza DNA) i warunki cyklu PCR.
Specyficzność analityczna	Dokonaj analizy (i) organizmów docelowych różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz (ii) odpowiednich organizmów nie będących docelowymi, w szczególności tych związanych z materiałem stanowiącym próbkę. Dla organizmów innych niż docelowe, stężenie kwasów nukleinowych powinno być wystarczająco wysokie, by zmaksymalizować możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych, ale na realnym poziomie. Dodatkowo, wyniki badania mogą być uzupełnione przez porównanie <i>in silico</i> sekwencji sond/primerów z sekwencjami z bibliotek genowych.
Selektywność	Nie ma zastosowania w odniesieniu do nicieni, jeśli zostały one uprzednio wyizolowane z matrycy. Jednakże jeśli PCR jest stosowany jako metoda wykrywania, określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. gleba, roślina) mają wpływ na działanie metody.
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń ekstraktów próbki o niskiej koncentracji. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Tabela 8. Ciąg dalszy

Techniki biochemiczne: np. elektroforeza enzymów, profil białek

Etap ten obejmuje także przygotowanie próbki.

Czułość analityczna	Określ najmniejszą liczbę osobników, które powinny być wykryte w celu umożliwienia przeprowadzenia wiarygodnej analizy, z zastosowaniem co najmniej trzech próbek, o ile jest to możliwe. Najmniejsza liczba osobników docelowego organizmu zależy od stanu próbki (dobry do bardzo złego), znanej zmienności wewnątrzgatunkowej, trudności w interpretacji cech itp. Parametry metody powinny być skrupulatnie zdefiniowane i wystandaryzowane.
Specyficzność analityczna	Dokonaj analizy (i) pewnej ilości organizmów docelowych oraz (ii) rodzajów lub gatunków organizmów nie będących docelowymi.
Selektywność	Nie ma zastosowania.
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń ekstraktów próbki o niskiej koncentracji. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Test pułapkowy lub biologiczny (łącznie z testem patogeniczności).

Czułość analityczna	Określ minimalną liczbę osobników zdolną do wywołania objawów lub namnożenia się w materiale roślinnym, z zastosowaniem co najmniej trzech powtórzeń. Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów metody, które powinny być skrupulatnie zdefiniowane i wystandaryzowane, tj. stadium rośliny testowej, metoda inokulacji. Jeśli nie uzyska się zgodnych wyników, należy przygotować i przebadać dodatkowe serie.
Specyficzność analityczna	Określ specyficzność testu biologicznego z użyciem (i) szczepów organizmu docelowego różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz (ii) zestawu organizmów nie będących docelowymi, w szczególności tych związanych z materiałem stanowiącym próbkę.
Selektywność	Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. stosowanie różnych odmian rośliny żywicielskiej) mają wpływ na działanie metody.
Powtarzalność	Użyj co najmniej 3 powtórzeń z minimalną liczbą osobników w celu określenia populacji i użyj roślin żywicielskich ustalonych w teście na specyficzność. W przypadku testu patogeniczności, te trzy powtórzenia powinny zawierać minimalną liczbę osobników zdolną do wywołania objawów. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Wirusologia i fitoplazmologia

Tabela 9. Wirusologia i fitoplazmologia (skorzystaj również ze wskazówek dotyczących stosowania tabel). Niniejsza tabela obejmuje wirusy, wiroidy i fitoplazmy

Techniki molekularne, np. PCR , real-time PCR, LAMP	
Ten etap obejmuje również techniki izolacji RNA/DNA z materiału stanowiącego próbkę.	
Czułość analityczna (względna czułość)	Ze względu na to, że koncentracja wirusów, wiroidów i fitoplazm nigdy nie jest znana, określ maksymalne rozcieńczenie umożliwiające wykrycie RNA/DNA. Wykonaj co najmniej 3 eksperymenty z seryjnymi rozcieńczeniami. Jeśli po wykonaniu 3 serii nie uzyska się zgodnych wyników, należy przygotować i przebadać dodatkowe serie. Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów metody, które powinny być skrupulatnie określone i wystandaryzowane, np. rodzaj odczynników do PCR (w szczególności polimerazy DNA) i warunki cyklu PCR.
Specyficzność analityczna	Dokonaj analizy (i) odpowiedniej ilości agrofagów docelowych oraz (ii) odpowiednich agrofagów nie będących docelowymi, różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim, w szczególności tych, które mogą być obecne w materiale stanowiącym próbkę. Dla agrofagów innych niż docelowe, stężenie kwasów nukleinowych powinna być wystarczająco wysoka, by zmaksymalizować możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych, ale na realnym poziomie. Dodatkowo, wyniki badań mogą być uzupełnione poprzez porównanie „ <i>in silico</i> ” sekwencji sond/primerów z sekwencjami z bibliotek genowych.
Selektywność	Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. stosowanie różnych odmian rośliny żywicielskiej) mają wpływ na działanie metody
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń ekstraktów próbki o niskiej (względnie) koncentracji. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.
Techniki serologiczne: ELISA i Direct Tissue Blot Immuno Assay, łącznie z przygotowaniem próbki (nie ma to zastosowania w odniesieniu do wiroidów)	
Czułość analityczna (względna czułość)	Wykonaj co najmniej 3 eksperymenty z seryjnymi rozcieńczeniami porażonej tkanki w wybranej zdrowej tkance. Określ najwyższe rozcieńczenie ekstraktów z próbki, w którym można wykryć agrofaga. Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów badania, które powinny być skrupulatnie określone i wystandaryzowane, np. wartość progowa gęstości optycznej (OD) w teście ELISA. Jeśli po wykonaniu 3 serii nie uzyska się zgodnych wyników, należy przygotować i przebadać dodatkowe serie.
Specyficzność analityczna	Określ specyficzność przeciwciał z użyciem (i) szczepów docelowego agrofaga różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz (ii) zestawu agrofagów nie będących docelowymi, w szczególności tych związanych z materiałem stanowiącym próbkę.
Selektywność	Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. stosowanie różnych odmian rośliny żywicielskiej) mają wpływ na działanie metody.
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń ekstraktów próbki o niskiej (względnie) koncentracji. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Tabela 9. Ciąg dalszy

Testy biologiczne: test na roślinie (używane głównie jako testy weryfikacyjne dla wirusów lub wiroidów, ale nie dla fitoplazm) oraz szczepienie	
Czułość analityczna (względna czułość)	Określ maksymalne rozcieńczenie zainfekowanej próbki w próbce zdrowej, zdolne do wywołania objawów lub namnożenia się w roślinach. Jest to jedynie oszacowanie rozcieńczeń, które mogą być używane. Wykonaj 3 serie z rozcieńczaniami. Czułość analityczna odnosi się do specyficznego zestawu parametrów metody, które powinny być skrupulatnie określone i wystandaryzowane, np. stadium rozwojowe rośliny żywicielskiej, metoda inokulacji i warunki inkubacji. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia. Nie jest właściwa dla szczepienia na roślinie.
Specyficzność analityczna	Określ specyficzność testu biologicznego z użyciem (i) szczepów agrofagów docelowych różnorodnych genetycznie, o różnym pochodzeniu geograficznym i żywicielskim oraz (ii) zestawu agrofagów nie będących docelowymi, w szczególności tych związanych z materiałem stanowiącym próbkę.
Selektywność	Określ, czy zmiany materiału stanowiącego próbkę (np. stosowanie różnych odmian rośliny żywicielskiej) mają wpływ na działanie metody.
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń ekstraktów próbki w odpowiednim rozcieńczeniu określonym w teście na czułość oraz dokonaj wyboru roślin żywicielskich na podstawie wyników dotyczących parametrów metody. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Techniki biochemiczne: np. elektroforeza, R-PAGE	
Czułość analityczna (względna czułość)	Wykonaj co najmniej 3 eksperymenty z seryjnymi rozcieńczeniami porażonej tkanki w wybranej zdrowej tkance. Określ najwyższe rozcieńczenie ekstraktów próbki, w którym można wykryć agrofaga. Parametry te powinny być skrupulatnie zdefiniowane i wystandaryzowane.
Specyficzność analityczna	Porównaj z odpowiednimi agrofagami docelowymi/białkami/kontaminantami i wykaż, że mogą być od siebie odróżnione. Zbadaj również zmienność wewnątrzgatunkową. Określ cechy, które mają być zidentyfikowane.
Selektywność	Nie ma zastosowania.
Powtarzalność	Dokonaj analizy co najmniej 3 powtórzeń ekstraktów próbki o niskiej (względnie) koncentracji. Jeśli nie zostaną uzyskane zgodne wyniki, należy przygotować i poddać badaniom dodatkowe powtórzenia.
Odtwarzalność	Podobnie jak w przypadku powtarzalności, lecz jeśli jest to możliwe, przeprowadzenie analiz przez różnych analityków, w różnych dniach i z użyciem różnego wyposażenia, o ile ma to zastosowanie.

Dodatek 6 – Walidacja metod morfologicznych i morfometrycznych mających zastosowanie np. w entomologii, nematologii, mikologii i botanice

Niniejsze wytyczne wynikają z doświadczenia ekspertów z paneli EPPO zajmujących się diagnostyką³, związanego z walidacją.

W przypadku identyfikacji na podstawie cech morfologicznych, ocena ekspercka opiera się na stosowaniu dostępnej dokumentacji w formie kluczy, oryginalnych opisów cech morfologicznych i fotografii okazów, które są uznawane przez ekspertów za dokumentację referencyjną wspierającą identyfikację. Jako że te dokumenty lub informacje dodatkowe zostały opracowane przez ekspertów z danej dziedziny, są one uznane w niniejszym standardzie za metody zwalidowane.

Przykładowe dokumenty lub informacje wspierające, uznawane za metody zwalidowane w niniejszym standardzie obejmują:

- Morfologiczne i morfometryczne metody zawarte w Standardach Międzynarodowych, takich jak Protokoły Diagnostyczne Międzynarodowej Konwencji Ochrony Roślin (IPPC) i Protokoły Diagnostyczne EPPO.
- Morfologiczne i morfometryczne metody, przeglądy taksonomiczne, opisy, łącznie z oryginalnymi artykułami, oraz klucze opublikowane w recenzowanych czasopismach specjalistycznych, łącznie z oryginalnymi artykułami.
- Okazy referencyjne i materiał typowy (holotypy, paratypy, lectotypy i neotypy) i fotografie referencyjne (okazy i fotografie powinny być zidentyfikowane i potwierdzone przez eksperta).
- Morfologiczne i morfometryczne metody powszechnie stosowane, które są opublikowane w nierecenzowanych czasopismach, łącznie ze źródłami elektronicznymi (w szczególności odnosi się to do kluczy).

Jak wyjaśniono w p. 5.4.4.2., laboratorium powinno potwierdzić, że jest w stanie właściwie przeprowadzać morfologiczną i morfometryczną identyfikację.

Laboratorium powinno być w stanie uzasadnić dokonany wybór metod morfologicznych i morfometrycznych, w szczególności tych, które nie są opisane w standardach międzynarodowych i recenzowanych czasopismach specjalistycznych.

³Uwzględniono również doświadczenia laboratorium kryminalistycznego związane z akredytacją morfologicznych i morfometrycznych metod identyfikacji.

Dodatek 7 – Przykład laboratoryjnych raportów dotyczących punktów krytycznych procesu diagnostycznego i odniesienie do niepewności pomiaru

Raport 1 – Identyfikacja punktów krytycznych i szacowanie niepewności pomiaru (dzięki uprzejmości National Institute of Biology, Słowenia, 2012)

Zakres	Diagnostyka fitoplazm		
Metoda (tytuł i numer protokołu)	Real-time PCR (02D-Pos43)		
Organizm szkodliwy	FD i BN		
Rodzaj próbki (opis, numer protokołu)	Winorośl, wektory, inne rośliny żywicielskie (02D-Pos10)		
Uwagi	/		
Osoba autoryzująca (podpis, data)	Natasha Mehle, 6.7.2012		
Inna osoba (podpis, data)	/		
Kierownik badania (podpis, data)	/		

Etap procesu	Możliwy wpływ na wyniki	Środki w celu zmniejszenia niepewności pomiaru	Dokument, w którym określono środki
Próbobranie – rodzaj próbki	Nierównomierne rozmieszczenie fitoplazm w próbce roślinnej. Owady załapane na pułapkę lepową są nieodpowiednie do analizy.	Nie mamy bezpośrednio kontroli nad sposobem próbobrania; jednakże jest on dokładnie określony. Przy przyjmowaniu próbek weryfikujemy przydatność próbki do analizy.	Roczny program specjalnej kontroli żółtaczk winorośli (Op. Prev: Program posebnega nadzora trsnih rumenic) 02D-Pos10
Próbobranie - termin	Sezonowa zmienność koncentracji fitoplazm w próbkach.	Termin próbobrania jest określony. Przy przyjmowaniu próbek weryfikujemy przydatność próbki do analizy (czy została pobrana w odpowiednim czasie/ porze).	Roczny program specjalnej kontroli żółtaczk winorośli (Op. Prev: Program posebnega nadzora trsnih rumenic) 02D-Pos10
Próbobranie – jednoznaczne oznakowanie próbek	Niejednoznaczne oznakowanie próbek – wynik analizy odnosi się do niewłaściwej próbki.	Nie mamy bezpośrednio całkowitej kontroli nad oznakowywaniem próbek, jednakże oznakowywanie próbek jest jasno określone. Przy przyjmowaniu próbek sprawdzamy, czy etykieta klienta na próbce odpowiada etykietce na raporcie z próbobrania.	Roczny program specjalnej kontroli żółtaczk winorośli (Op. Prev: Program posebnega nadzora trsnih rumenic) 02R-Nav05
Transport próbek do laboratorium	Długotrwałe przechowywanie próbek w wysokiej temperaturze, a także zamrażanie i rozmrażanie próbek może powodować ich uszkodzenie, a w konsekwencji zmniejszyć możliwość wykrycia w tych próbkach fitoplazm.	Sposoby dostarczania próbek do laboratorium są określone. Przy przyjmowaniu próbek sprawdzamy ich status.	Roczny program specjalnej kontroli żółtaczk winorośli (Op. Prev: Program posebnega nadzora trsnih rumenic) 02D-Pos10)

Tabela Ciąg dalszy

Etap procesu	Możliwy wpływ na wyniki	Środki w celu zmniejszenia niepewności pomiaru	Dokument, w którym określono środki
Przyjmowanie próbek	Próbka nie została przekazana odpowiedzialnej osobie – analizy nie są przeprowadzone na czas lub wcale nie są przeprowadzane.	Wszyscy zatrudnieni muszą być zaznajomieni z instrukcjami przyjmowania próbek.	02R-Nav05; 02R-Sez07
Dokumentowanie próbek	Informacje na temat dostarczonych próbek nie docierają do odpowiedzialnej osoby - analizy nie są przeprowadzone na czas lub wcale nie są przeprowadzane, albo też wykonywane są niewłaściwe analizy.	Dokładne instrukcje na temat zapisywania nowo przyjętych próbek.	02D-Sez07; 02R-Nav01, 02D-Nav16
Przechowywanie próbek	Długotrwałe przechowywanie próbek w wysokiej temperaturze, a także zamrażanie i rozmrażanie próbek może powodować ich uszkodzenie, a w konsekwencji zmniejszyć możliwość wykrycia w tych próbkach fitoplazm.	Wyznaczone miejsce przechowywania próbek.	02R-Nav05
Wybór metody	Została zastosowana niewłaściwa metoda	Ścisłe określone, liczne metody oraz dobrze zdefiniowana kolejność procedur w danym badaniu.	02D-Sez01, 02D-Pos10
Przygotowanie próbki do analiz	Kontaminacja pomiędzy próbkami. Pobranie niewłaściwej części próbki; niewystarczająca homogenizacja próbki.	Określone są procedury przygotowania i homogenizacji próbki, łącznie ze sposobem wykonywania czynności tak, by zapobiec kontaminacji pomiędzy próbkami. Procedury te przeprowadzają wyłącznie odpowiedzialne, upoważnione osoby. Procedura homogenizacji (łącznie z jednocześnie przeprowadzaną ekstrakcją DNA) jest kontrolowana poprzez stosowanie NKI oraz KE (KE jest stosowana oddzielnie dla każdej próbki).	02D-Pos6, 02D-Pos54, 02D-Pos43, 02R-Sez04

Tabela Ciąg dalszy

Etap procesu	Możliwy wpływ na wyniki	Środki w celu zmniejszenia niepewności pomiaru	Dokument, w którym określono środki
Ekstrakcja	Wybór niewłaściwej metody ekstrakcji DNA; błąd podczas przeprowadzania procedury ekstrakcji; kontaminacja podczas przeprowadzania procedury ekstrakcji.	Wybór i przeprowadzanie procedury ekstrakcji są dobrze określone. Są one przeprowadzane wyłącznie przez odpowiedzialne, upoważnione osoby. W procedurze ekstrakcji uwzględnia się NKI. Stosowność procedury ekstrakcji DNA jest weryfikowana dla każdej pojedynczej próbki poprzez amplifikację kontroli wewnętrznej (endogeny kwas nukleinowy, KE).	02D-Pos6, 02D-Pos54, 02D-Pos43, 02R-Sez04
Wykonywanie badań – analityk?	Brak znajomości metody – błąd w wykonaniu.	Badanie jest wykonywane wyłącznie przez wykwalifikowanego i przeszkolonego analityka.	02R-Sez04
Wykonywanie badań – wpływ inhibitorów?	Wynik fałszywie negatywny z powodu obecności inhibitorów reakcji PCR w ekstrakcie DNA.	Przebadanie dodatkowych serii rozcieńczeń DNA, jeśli przewiduje się obecność inhibitorów w ekstrakcie DNA. Procedurę ekstrakcji powtarza się z zastosowaniem alternatywnej zwalidowanej (innej) procedury ekstrakcji	02D-Pos43, 02D-Pos06
Wykonywanie badań – wpływ matrycy na specyficzność?	Nowa lub nieznaną matryca – niespecyficzna reakcja przy użyciu primerów i sond oligonukleotydowych.	W przypadku nowego rodzaju próbek i/lub wykręć (np. nowe rośliny żywicielskie), przeprowadzamy dodatkowy test potwierdzający.	02D-Pos10, 02D-Pos43
Wykonywanie badań – wpływ matrycy na czułość?	Nowa lub nieznaną matryca – spadek czułości metody.	Jeśli spodziewana jest niska koncentracja fitoplazm w próbkach (na podstawie wyników KE), przeprowadzane są dodatkowe badania z bardziej stężonym DNA.	02D-Pos43
Wykonywanie badań – możliwość kontaminacji?	Fałszywie pozytywne wyniki.	Włączanie kontroli wewnętrznych: NTC 1, NTC 2. Dobrze określony sposób wykonywania metody, co zapobiega ryzyku kontaminacji. Poszczególne etapy procedury analitycznej są prowadzone w oddzielnych pomieszczeniach.	02D-Pos48, 02D-Pos48 02D-Pos18

Tabela Ciąg dalszy

Etap procesu	Możliwy wpływ na wyniki	Środki w celu zmniejszenia niepewności pomiaru	Dokument, w którym określono środki
Wykonywanie badań – wpływ materiałów i sprzętu w laboratorium?	Wpływ na pomiar fluorescencji: kurz na płytce testowej/folii, talk na rękawiczkach, dotyknięcie folii/spodniej strony płytki testowej. Zwiększona możliwość kontaminacji: końcówki pipet bez filtra.	Włączenie kontroli wewnętrznych: NTC 1, NTC 2. Stosowanie rękawiczek laboratoryjnych bez talku, używanie końcówek pipet z filtrem. Przechowywanie płytek testowych i folii w warunkach bez kurzu.	02D-Pos48
Wykonywanie badań – wpływ wyposażenia laboratoryjnego?	Niedokładne pipetowanie małych objętości.	Używanie wyłącznie skalibrowanych pipet. Włączanie KP1 i KP2 ze znaną wartością C_t (sprawdzanie czy wartość C_t jest odpowiednia)	02D-Obr30, 02D-Pos43
Wykonywanie badań – wpływ aparatury?	Teoretycznie możliwy.	Sprawdzenie, czy aparat jest odpowiedni poprzez porównanie z innym urządzeniem/aparatem przed jego zastosowaniem w diagnostyce.	Przykład jak w Raporcie z testu odpowiedności D0002/12
Wykonywanie badań – wpływ odczynników?	Przetknięte odczynniki, niewłaściwe przechowywanie odczynników, niewłaściwy wybór odczynników, słaba jakość partii odczynników, odczynniki skontaminowane – wpływ na amplifikację, wyniki fałszywie pozytywne/negatywne.	Włączenie kontroli wewnętrznych: NTC 1, NTC 2. Włączenie PK 1 i PK 2 o znanej wartości C_t (weryfikacja odpowiedności C_t). Zapisywanie daty ważności odczynników, numeru partii, numeru inwentarzowego lub daty przygotowania mieszaniny PPS.	02D-Obr30; 02D-Nav24
Wykonywanie badań – wpływ środowiska?	Wpływ temperatury podczas pipetowania niewielkich objętości.	Sprawdzanie temperatury w pomieszczeniu do przygotowywania mastermixu oraz w pomieszczeniu do dodawania DNA.	02D-Obr30; 02D-Nav48
Wykonywanie badań – analiza wyników	Złe ustalenie progu – fałszywie negatywne wyniki; sygnał, który nie jest skutkiem amplifikacji – wynik fałszywie pozytywny	Weryfikacja krzywych amplifikacji (na przykład Multicomponent PLOT)	02D-Pos48; 02D-Nav43
Określanie i wprowadzanie wyników badania	Niewłaściwa interpretacja wyników uzyskanych w metodzie	Wyraźnie zdefiniowana interpretacja wyników (na przykład granica wykrywalności, równoległe badania i kontrole). Odpowiedzialna osoba upoważniona do oceny i interpretacji wyników musi zweryfikować dokładność wprowadzonych danych.	02D-Pos43; 02D-Pos48; 02D-Nav01, 02R-Sez07

Tabela Ciąg dalszy

Etap procesu	Możliwy wpływ na wyniki	Środki w celu zmniejszenia niepewności pomiaru	Dokument, w którym określono środki
Końcowy wynik badania – wynik, który stanowi ostateczne potwierdzenie obecności/ nieobecności agrofaga	Końcowy wynik badania zależy od wyników cząstkowych dla różnych pojedynczych amplikonów – niejasne określenie zasad formułowania ostatecznego wyniku może prowadzić do niewłaściwych wniosków. Niewłaściwe sformułowane ostateczne wyniki mogą zdezorientować klienta.	Jasno określone kryteria formułowania końcowych wyników. Tylko osoby odpowiedzialne i upoważnione do przeprowadzenia ostatecznego etapu mogą sformułować ostateczny wynik. Formułowanie wyników badania jest określone.	02D-Pos10; 02D-Pos43; 02R-Sez07 02D-Pos18
Informowanie	Końcowe wyniki nie są wysłane do wszystkich stron wskazanych w umowie do odbioru końcowego wyniku. Zwłoka w informowaniu o wynikach analiz.	Jasno sformułowane wytyczne dotyczące informowania o wyniku końcowym. Wszelka korespondencja z klientem jest archiwizowana (zapewnia się możliwość prześledzenia korespondencji dotyczącej poszczególnych próbek). Sytem BiaLims informuje nas automatycznie o zbliżającym się/ upływającym terminie przekazania wyników analiz.	02D-Nav01, 02D-Nav16
Wystawienie raportu z badań	Raport z badań nie jest wysłany do wszystkich stron wskazanych w umowie do odbioru końcowego wyniku.	Jasno sformułowane wytyczne dotyczące wystawiania i wysyłki raportu z badań.	02D-Nav01
Archiwizowanie	Skarga klienta, zamawiającego lub posiadacza na przeprowadzone analizy.	Zorganizowane, uporządkowane archiwum raportów z badań próbek z poprzednich lat. Zapewniona możliwość odtworzenia procesu od przyjęcia próbki do wystawienia raportu z badań. Próbki przechowywane w magazynie co najmniej do czasu wystawienia raportu z badań. Wszelkie ważne ekstrakty DNA są przechowywane w kolekcji izolatów DNA.	02D-Vzo01, 02D-Poz18, 02D-Nav01, 02R-Nav02, 02R-Nav08.
Inne/uwagi	/		

Raport 2 – Wykrywanie Flavescence dorée (FD) oraz Bois noir (BN) z użyciem real-time PCR

Zwalidowane metody:

- Francuska metoda MOA006 część A i B wersja 1b – Wykrywanie fitoplazm z grupy 16SrV (flavescence dorée) oraz z grupy 16SrXII (bois noir)/ Matryca: *Vitis* sp.
- Errata MOA006 część A z dnia 7 marca 2012.

Odniesienie do wewnętrznego SOP: AMO07S23

Identyfikacja źródeł niepewności	Rodzaj niepewności	Częstotliwość	Działania w celu zmniejszenia/ uniknięcia niepewności i związana z tym dokumentacja	Udział w niepewności całkowitej
Personel				
Identyfikacja partii i próbek	Błąd w przypisywaniu wyniku do próbki	Rzadko	Naniesienie uproszczonego numeru próbki na paczkę i na dokumenty związane z rejestracją APRO6002	Nieistotny
Etykietowanie statywów oraz pojemników/ probówek (PCR)	Błąd w przypisywaniu wyniku do próbki	Rzadko	Stosowanie uproszczonego numeru próbki na pojemnikach podczas procesu analitycznego (torebki, probówki, plan rozmieszczenia próbek w PCR ...) APQA	Nieistotny
<i>Szkolenie personelu</i>	Błąd ludzki podczas procesu analitycznego	Rzadko	Szkolenie i upoważnianie wykonawców APR02003/APR02004	Nieistotny
Odczyt i interpretacja wyników PCR	Ryzyko fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych wyników	Rzadko	Zasady decyzyjne jasno określone w systemie zarządzania jakością AMO07T42 Szkolenie i upoważnianie wykonawców APR02003/APR02004	Nieistotny
Edytowanie raportu: przenoszenie informacji	Błąd w przenoszeniu	Niezbyt często	Ogólny przegląd przez kierownika technicznego. Sprawdzenie poprawności zapisów w raporcie przez kierownika technicznego i kierownika administracyjnego. Raport podpisany przez kierownika administracyjnego.	Nieistotny
Prowadzenie analizy i przygotowywanie buforów, roztworów i mieszanin reakcyjnych	Błąd w procesie przygotowywania (ilości ...)		Kompletne i szczegółowe SOPy, które umożliwiają wiarygodne otworzenie procesu AMO07P32, AMO05T28 i AMO07T42	Nieistotny
Materiały				
Rozmieszczenie docelowych fitoplazm w tkance roślinnej	Przypadkowe rozmieszczenie fitoplazm w tkance roślinnej	Często	Pobieranie niezbędnych ilości ogonków liściowych i/lub nerwów głównych z liści winorośli z objawami AMO07T42	Istotny

Tabela Ciąg dalszy

Identyfikacja źródeł niepewności	Rodzaj niepewności	Częstotliwość	Działania w celu zmniejszenia/ uniknięcia niepewności i związana z tym dokumentacja	Udział w niepewności całkowitej
Próbka w stanie rozkładu w momencie dostarczenia do laboratorium	Rozwój organizmów saprofitycznych i/lub rozkład materiału roślinnego prowadzący do zmniejszenia stopnia porażenia.	Rzadko	Odmowa przyjęcia próbki, poinformowanie klienta: AMMQSE06-APR06002	Nieistotny
Rozkład próbek podczas przechowywania	Rozwój organizmów saprofitycznych i/lub rozkład materiału roślinnego prowadzący do zmniejszenia stopnia porażenia.	Rzadko	Wymagania co do warunków przechowywania są określone i stosowane. APQA, APRO6002, AMO07T42	Nieistotny
Próbka z dużą ilością materiału roślinnego („bogata” próbka)	Ryzyko obecności inhibitorów	Okazjonalnie	Właściwe wyniki uzyskane dla kontroli pozytywnej winorośli stanowią potwierdzenie braku inhibicji amplifikacji AMO07T42 .	Nieistotny
Jakość reagentów, roztworów, buforów i podłoży	Nieprzestrzeganie wymagań dotyczących warunków przechowywania, daty ważności, kontaminacja	Mało prawdopodobne	Określanie miejsc i warunków przechowywania zgodnie z zaleceniami dostawcy oraz tych określonych przez laboratorium. Kontrola temperatury w komorach klimatycznych (np. zamrażarce) służących do przechowywania reagentów: APQM Miejsca przechowywania oddzielone od stref przyjmowania próbek i przechowywania kontroli pozytywnych: APQA Stosowanie odpowiednich kontroli w każdym prowadzonym badaniu: AMO07T42 Regularna zmiana pojemnika do barwienia żelu bromkiem etydydny, zgodnie z APQT01	Nieistotny
Przygotowywanie roztworów, buforów i podłoży	Błąd w określaniu masy, objętości i pH	Mało prawdopodobne	Kontrola metrologiczna wag, pipet, pH – metrów w celu zapewnienia zgodności z wymaganiami i określenie błędów maksymalnych: APQM	Nieistotny

Tabela Ciąg dalszy

Identyfikacja źródeł niepewności	Rodzaj niepewności	Częstotliwość	Działania w celu zmniejszenia/ uniknięcia niepewności i związana z tym dokumentacja	Udział w niepewności całkowitej
Wyposażenie/ pomiary Wyposażenie pod kontrolą metrologiczną lub nie	Nieprzestrzeganie wymagań metrologicznych i technicznych	Mało prawdopodobne	Określenie i wdrożenie metrologicznego planu jakościowego: APQM Procedury i programy kalibracji/sprawdzania: APQM/ APR03032 Pipety: APR03009/ APR03010 Wagi: APR03007/ APR03008 pH-metry: APR03006 termometry: APR03031 urządzenia do PCR: APR03036 Ustanowienie planu utrzymywania i czyszczenia: APR03005. APQN Techniczne zatwierdzenie przez kierownika ds. metrologii i kierownika technicznego przed przekazaniem do serwisu: APR03001	Nieistotny
Środowisko				
Kontaminacja krzyżowa: ogólnie	Ryzyko fałszywie pozytywnych wyników	Rzadko	Plan dezynfekcji wyposażenia i powierzchni roboczych. Przestrzeganie „drogi jednokierunkowej” podczas procesu analitycznego: APQA	Nieistotny
Kontaminacja krzyżowa: PCR	Ryzyko fałszywie pozytywnych wyników	Rzadko	Oddzielne pomieszczenia do „przygotowania mieszaniny reakcyjnej”, „dodawania ekstraktu DNA”, „amplifikacji” i „elektroforezy” oraz stosowanie odpowiednich kontroli APQT01	Nieistotny
Przechowywanie próbek	Rozwój organizmów saprofitycznych i/lub rozkład materiału roślinnego prowadzący do zmniejszenia stopnia porażenia	Rzadko	Wymagania co do warunków przechowywania są określone i stosowane APQA, APRO6002, AMO07T42	Nieistotny
Metoda/ Proces				
Kontrole pozytywne dla całego procesu	Kontrola nie wykryta	Okazjonalnie	Zdefiniowane zasady: Jeśli kontrola pozytywna ekstrakcji nie dała właściwych rezultatów, natomiast inna próbka z tej samej serii ekstrakcji dała wynik pozytywny, wtedy analiza przebiegła prawidłowo. Jeśli żadna próbka nie dała pozytywnego wyniku (rzadki przypadek) analiza nie przebiegła prawidłowo. Badanie należy powtórzyć. Stosowanie wewnętrznej kontroli pozytywnej winorośli dla każdej próbki pozwalające na walidację jakości każdego ekstraktu AMO07T42	Nieistotny

Tabela Ciąg dalszy

Identyfikacja źródeł niepewności	Rodzaj niepewności	Częstotliwość	Działania w celu zmniejszenia/ uniknięcia niepewności i związana z tym dokumentacja	Udział w niepewności całkowitej
Czułość/ granica wykrywalności	Obecność organizmu docelowego poniżej granicy wykrywalności	Możliwe. Częstotliwość nie jest określona	Ryzyko związane z zastosowaną metodą. Stosowanie kontroli na granicy wykrywalności: MO07T42 . Parametry metody określone w wewnętrznym raporcie z walidacji FD BN 2009.	Istotny W powiązaniu z granicami wykrywalności stosowanych metod

Tłumaczenie z języka angielskiego: Hanna Bagińska
31.10.2016 r.